

Aus der Klinik für Radiologie, Nuklearmedizin
und physikalische Therapie
der Freien Universität Berlin im Klinikum Steglitz
Abteilung für Nuklearmedizin
(Direktor: Prof. Dr. med. K. Oeff)

**UNTERSUCHUNGEN ZUR INTRATHYREOIDALEN
BIOSYNTHESE UND ZUM EXTRATHYREOIDALEN
STOFFWECHSEL VON SCHILDDRÜSENHORMONEN
UND VERWANDTEN JODAMINOSÄUREN BEI
VARIIERENDER JODZUFUHR IN DER RATTE**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Karin Petersen
aus Struxdorf/Schleswig

1983





Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Klinik für Radiologie, Nuklearmedizin und physikalische
Therapie der Freien Universität Berlin im Klinikum Steglitz
Abteilung für Nuklearmedizin (Direktor: Prof. Dr. med. K. Oeff)

UNTERSUCHUNGEN ZUR INTRATHYREOIDALEN BIOSYNTHESE
UND ZUM EXTRATHYREOIDALEN STOFFWECHSEL VON SCHILD-
DROSENHORMONEN UND VERWANDTEN JODAMINOSÄUREN BEI
VARIIERENDER JODZUFUHR IN DER RATTE

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Karin Petersen
aus Struxdorf/Schleswig

Referent: Priv.Doiz.Dr.-Ing. H. M e i n h o l d

Korreferent: Prof.Dr.med.M. H o p f

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fachbereiche der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 8.Oktober 1983

	Seite
1 Einleitung	7
1.1 Beschreibung der Schilddrüsenhormone	7
1.1.1 Hormonsynthese	7
1.1.2 Hormonfreisetzung	10
1.1.3 Schilddrüsenhormone in der Peripherie	12
1.1.4 Abbauege der Schilddrüsenhormone in der Peripherie	14
1.2 Theoretische Grundlagen der Hormonanalyse mittels des Radioimmunoassays	17
1.3 Voraussetzung für die technische Durchführung eines Radioimmunoassays	18
1.4 Problemstellung	19
2 Material und Versuchstiere	21
2.1 Material	21
2.2 Versuchstiere	23
3 Methoden	27
3.1 Aufarbeitung der Rattenschilddrüsen	27
3.2 Ausführung der radioimmunologischen Bestimmung der Jodaminsäure in den Schilddrüsenhydrolysaten und im Serum	31
3.3 Serumextraktion von 3,3'-T ₂	32
3.4 Entwicklung eines Radioimmunoassays für 3',5'-Dijodthyronin	34
3.4.1 Herstellung von ¹²⁵ J-markiertem 3',5'-Dijodthyronin	34
3.4.2 Titration des Antiserums	35
3.4.3 Erstellung einer Standardkurve	35

	Seite
3.3.4	Qualitätskontrolle 36
3.4.5	Experimentelle Durchführung der radioimmunologischen 3',5'-Dijodthyronin-Bestimmung 36
4	Ergebnisse 37
4.1	Untersuchungen zur Methodik der Schilddrüsenaufarbeitung und radioimmunologischen Konzentrationsmessungen 37
4.1.1	Proteolytische Aufspaltung von in vivo-markierten Rattenschilddrüsen mittels Pronase 37
4.1.2	Beeinflussung der Proteolyse durch 1-Methyl-1-mercapto-imidazol (MMI) 40
4.1.3	Einfluß der Gewebekonzentration auf die Thyroxinkonzentration 41
4.1.4	Richtigkeitskontrolle der radioimmunologischen Trijodthyronin- und Dijodtyrosin-Bestimmung 42
4.1.5	Charakteristika des 3',5'-Dijodthyronin-Radioimmunoassay 45
4.1.5.1	3',5'-T ₂ -Markierung 45
4.1.5.2	Antiserumtitration 49
4.1.5.3	3',5'-Dijodthyronin-Standardkurve 50
4.1.5.4	Qualitätsmerkmale des 3',5'-Dijodthyronin-Radioimmunoassay 52
4.1.5.5	Kreuzreaktivitätskorrektur der gemessenen 3',5'-Dijodthyroninkonzentrationen im Schilddrüsenhydrolysat 56
4.2	Auswirkungen der abgestuften Jodalimentation auf das Gesamtkörpergewicht und Schilddrüsen-gewicht 58
4.3	Intra- und extrathyreoidale Jodaminosäurekonzentrationen bei unterschiedlichen Jodmangelzuständen 59

	Seite
4.3.1 Jodaminosäurenkonzentrationen im Schilddrüsenhydrolysat	59
4.3.2 Jodthyroninkonzentrationen im Serum jodinsuffizienter Ratten	64
4.4 Intra- und extrathyreoidale Jodamino- säurekonzentrationen bei Jodüberschuß	67
4.4.1 Jodaminosäurekonzentrationen im Schilddrüsenhydrolysat	67
4.4.2 Jodthyroninkonzentrationen im Serum (Jodüberschuß)	68
4.5 Intrathyreoidaler Jodaminosäurestatus bei Jodmangel und Jodüberschuß	69
5 Diskussion	73
5.1 Schilddrüsenaufarbeitung	73
5.2 3',5'-Dijodthyronin-Assay	74
5.3 Jodaminosäurekonzentrationen in der Schilddrüse und im Serum	78
6 Zusammenfassung	88
7 Literaturverzeichnis	90

ABKÜRZUNGEN

fmol/R	= Fentomol pro Röhrchen
mCi	= Millicurie
µCi	= Mikrocurie
cpm	= Impulse pro Minute
h	= Stunde
SD	= Schilddrüse
NID	= normales Jodfutter (normal iodine diet)
LID	= Jodmangelfutter (low iodine diet)
i.p.	= intraperitoneal
KJ	= Kaliumjodid
MMI	= 1-Methyl-1-mercapto-imidazol
ANS	= 8-Anilinonaphthalin-1-sulfonsäure
BSA	= Rinderserumalbumin
TBG	= Thyroxin-bindendes Globulin
TBPA	= Thyroxin-bindendes Präalbumin
TSH	= Thyreoidea-stimulierendes Hormon
PBJ	= Protein-bindendes Jodid
MIT	= 3-Jod-L-tyrosin
DIT	= 3,5 -Dijod-L-tyrosin
T ₀	= L-Thyronin
3-T ₁	= 3-Jod-L-thyronin
3'-T ₁	= 3'-Jod-L-thyronin
3,5-T ₂	= 3,5-Dijod-L-thyronin
3,3'-T ₂	= 3,3'-Dijod-L-thyronin
3',5'-T ₂	= 3',5'-Dijod-L-thyronin
rT ₃	= 3,3',5'-Trijod-L-thyronin (reverses T ₃)
T ₃	= 3,5,3'-Trijod-L-thyronin
T ₄	= L-Thyroxin

1 EINLEITUNG

Der endemische Kropf- verursacht durch Jodmangel - ist eine weltweite, häufig vorkommende Erkrankung. Viele Grundlagenuntersuchungen zu diesem Jodmangelproblem wurden an der Ratte durchgeführt, zum einen, weil sich durch veränderte Jodzufuhr sehr schnell Auswirkungen auf den Schilddrüsenhormonhaushalt des Tieres induzieren ließen, zum anderen, weil das Verhalten der Hypophysen-Schilddrüsenadaptation auf Jodmangel der beim Menschen ablaufenden Reaktion ähnelt.

Mit Hilfe neuer radioimmunologischer Methoden zur Konzentrationsbestimmung der Schilddrüsenhormone wie auch ihrer Vorläufer bei der Hormonbiosynthese und ihrer metabolischen Abbauprodukte, sollten weitere Informationen über den intra- und extrathyreoidalen Hormonhaushalt gewonnen werden. Vorangestellt wird ein kurzer Überblick über den Jodstoffwechsel und den damit verbundenen Schilddrüsenhormonmetabolismus.

1.1 Biochemie der Schilddrüsenhormone

1.1.1 Hormonsynthese

Jod ist für die Schilddrüsenhormonsynthese von entscheidender Bedeutung. Mit der Nahrung aufgenommenes Jod wird zu Jodid reduziert; Jodid wird aktiv durch die Basalmembran der Follikelepithelien der Schilddrüse (Thyreozyten) aus dem zirkulierenden Blut resorbiert und in der Schilddrüse konzentriert. Bevor dieses Jodid als jodierendes Agens wirken kann, muß es oxidiert werden. Von den bekannten biologischen Oxidationsmitteln sind nur H_2O_2 und O_2 in der Lage, Jodid zu oxidieren.

Schon 1944 versuchten DEMPSEY (24) sowie KESTON (46) nachzuweisen, daß eine Peroxidase an dem Jodinationsvorgang beteiligt sei. Doch die früheren Versuche, Peroxidaseaktivitäten nachzuweisen (32), blieben erfolglos, wahrscheinlich, weil mit den damaligen Versuchsmethoden das zellgebundene Peroxidasensystem nicht darzustellen war.

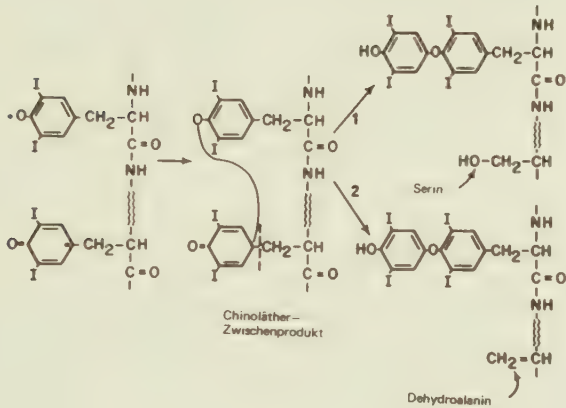
Erst 1959 zeigte ALEXANDER (2), daß eine Gewebesperoxidase an der Jodinationsreaktion beteiligt ist. Dieses Ergebnis konnte durch weitere Arbeiten verifiziert werden (22, 47). 1970 gelang es schließlich einer Arbeitsgruppe um TAUROG (89), die Thyreoperoxidase aus Schilddrüsengewebe zu isolieren. Mit diesem gereinigten TPO wurde in einer weiteren in vitro-Studie (87) der Nachweis geführt, daß die TPO auch die Jodisation mehrerer Proteine katalysiert, wobei häufig das Reaktionsprodukt Thyroxin entstand. Daraus resultiert, daß die Peroxidase nicht allein den Oxidationsvorgang katalysiert, sondern auch an der Kopplung des Jods an das Tyrosylradikal beteiligt ist. Von den getesteten Molekülen hob sich das Thyreoglobulinmolekül dadurch ab, daß es sowohl bei niedriger als auch bei ausreichender Jodination den höchsten Wirkungsgrad in der Thyroxinbildung besaß.

Wie INQUE u. TAUROG (45) und TAUROG (87) nachweisen konnten, findet die Jodisation der Tyrosylradikale in der Rattenschilddrüse fast ausschließlich am voll entwickelten Thyreoglobulinmolekül statt, - beim Menschen werden auch Untereinheiten des Thyreoglobulins jodiert -; es entstehen 3-Monojodtyrosin (MIT) und 3,5-Dijodtyrosin (DIT).

Der verbleibende Schritt in der Hormonsynthese ist die Kopplung zweier Dijodtyrosinresiduen beziehungsweise eines Dijod- mit einem Monojodtyrosinmolekül, um die Hormone Thyroxin oder Trijodthyronin zu erhalten.

Nach TAUROG (87) basiert die Kopplungsreaktion auf einem intramolekularen Mechanismus innerhalb eines Thyreoglobulinmoleküls. Das hypothetische Reaktionsschema der intramolekularen Thyroxinbildung zeigt Abbildung 1.

Abb.1: T_4 -Synthese in der Schilddrüse. - Intramolekularer Mechanismus nach TAUROG (87)



Nach LAMAS und Mitarb., (48) ist diese Kopplung ein oxidativer Vorgang, der von derselben Peroxidase - wie oben beschrieben - katalysiert wird. Der Kopplungsmechanismus bedingt nach DeGROOT u. NIEPONMISZCZE (22) den enzymatischen Transfer von entweder freien Jodtyrosinradikalen oder positiv geladenen Ionen innerhalb des Thyreoglobulinmoleküls. Weiterhin scheint die Konfiguration des Proteins auf die Kopplungsreaktion einen Einfluß zu haben. Nach DUNN (27) ist es möglich, daß spezifische, dem Thyroxinrest im Thyreoglobulin benachbart lagernde Aminosäuresequenzen diesen Konformationsvorgang sowie die enzymatische Erkennung von passenden Kopplungsstellen fördern. Das intrathyreoidale Syntheseverhältnis von Thyroxin zu Trijodthyronin ist somit abhängig von den vorhandenen

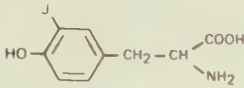
DIT- beziehungsweise MIT-Molekülen im Thyreoglobulin. Neben den hormonell aktiven Jodthyroninen - T_3 und T_4 -, die hauptsächlich bei dieser Kopplungsreaktion entstehen, werden noch weitere Tri- und Dijodthyronine in geringen Konzentrationen in der Schilddrüse nachgewiesen, diese sind rT_3 , $3,3'T_2$ sowie $3',5'-T_2$. Abbildung 2 zeigt die chemischen Strukturformeln der natürlich vorkommenden Jodthyronine und -tyrosine.

1.1.2 Hormonfreisetzung

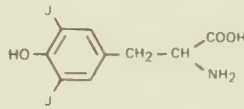
Die Schilddrüsenhormone, die in Form des Thyronin-Thyreoglobulin-Komplexes gespeichert vorliegen, müssen, bevor sie in die Blutbahn sezerniert werden können, durch Spaltung der kovalenten Peptidbindung aus der Proteinmatrix gelöst werden. Dieser Vorgang erfolgt nach heutiger Vorstellung in der Weise, daß an der apikalen Seite der Drüsenzelle durch Endozytose kleine Kolloidtropfen entstehen. Diese Tropfen, die das Thyreoglobulin enthalten, wandern durch die Zelle zur basalen Zellmembran (23, 26, 76, 96, 97). Auf dieser Wanderung vereinen sie sich mit Lysosomen, die unter anderem proteolytische Enzyme enthalten. Die Migration der Lysosomen zu den Kolloidtropfen wird durch TSH vermittelt (75). In den entstandenen Phagolysosomen wird während der Wanderung das Thyreoglobulin aufgespalten. Es entstehen freie Aminosäuren, sowie Jodthyronine und -tyrosine.

Die freien Jodtyrosine werden innerhalb der Schilddrüse durch eine spezifische Jodtyrosin-Dejodase größtenteils dejodiert (56, 62, 80). Das freigesetzte Jod wird dem Prozeß der Jodisation wieder zugeführt; es bildet somit einen endogenen Jodpool der Schilddrüse (40, 60). Entgegen früheren Darstellungen der vollständigen Dejodierung der Tyrosine

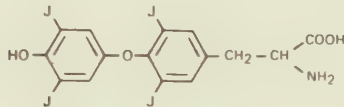
Abb.2: Strukturformel natürlich vorkommender Jodtyrosine und Jodthyronine



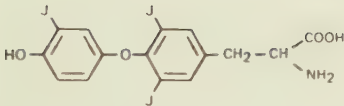
MIT



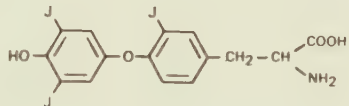
DIT



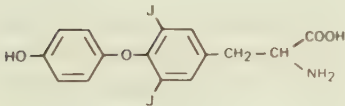
T₄



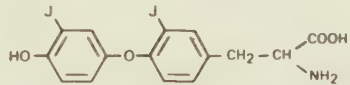
T₃



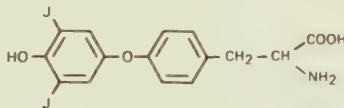
rT₃



3,5-T₂



3,3'-T₂



3',5'-T₂

- | | |
|----------------------|-----------------------------|
| MIT | = 3-Jod-L-tyrosin |
| DIT | = 3,5-Dijod-L-tyrosin |
| T | = L-Thyroxin |
| T ₄ | = 3,5,3'-Trijod-L-thyronin |
| rT ₃ | = 3,3',5'-Trijod-L-thyronin |
| 3,5-T ₂ | = 3,5-Dijod-L-thyronin |
| 3,3'-T ₂ | = 3,3'-Dijod-L-thyronin |
| 3',5'-T ₂ | = 3',5'-Dijod-L-thyronin |

wurde von NELSON und Mitarbeitern (62) sowie von MEINHOLD (56) gezeigt, daß geringe Mengen Dijodtyrosin in die Peripherie sezerniert werden. Aus den Phagolysosomen freigesetzte Jodthyronine werden in sehr geringer Menge dejodiert (33, 37), bevor sie sezerniert werden können. Der Sekretionsvorgang der Jodthyronine wird über einen hypothalamisch-hypophysär-thyreoidalen Reglerkreis gesteuert, der hier nicht weiter erläutert werden soll.

1.1.3 Schilddrüsenhormone in der Peripherie

Die wichtigsten Sekretionsprodukte der Schilddrüse sind das Thyroxin (T_4), Trijodthyronin (T_3) sowie reverse Trijodthyronin (rT_3), wobei T_4 den quantitativ größten Anteil einnimmt. T_4 liegt in der Schilddrüse in 10- bis 20-fach höherer Konzentration als T_3 vor und ist 80-100mal häufiger als rT_3 (12, 13, 59, 88). Die 3,3'- T_2 und 3',5'- T_2 -Jodaminosäurekonzentrationen intrathyreoidal waren im Verhältnis zur Thyroxinkonzentration noch wesentlich niedriger als die rT_3 -Konzentrationen (siehe eigene Ergebnisse).

Die Schilddrüsenhormone werden im Blut in fester aber nicht kovalenter Bindung an spezielle Plasmaproteine transportiert, diese sind: Thyroxinbindendes Globulin (TBG), thyroxinbindendes Praealbumin (TBPA), Serumalbumin.

Das TBG ist der wichtigste Carrier der Schilddrüsenhormone in der Peripherie. Es bindet 1 Molekül Thyroxin pro Proteinmolekül mit einer sehr hohen Assoziationskonstante ($ca\ 10^{10}$), die T_3 -Protein-Bindung ist weniger stark ausgeprägt, wie von STERLING und Mitarbeitern (83) nachgewiesen wurde.

Das TBPA bindet ebenfalls Schilddrüsenhormone. Dieses Protein ist im Serum zwar in einer höheren Konzentration als

TBG vorhanden, bindet aber nach NILSON u. PETERSON (63) T_4 und T_3 mit einer niedrigeren Assoziationskonstanten (ca 10^7 respective 10^6).

Wenn die oben genannten Proteine mit Hormonen gesättigt sind, binden sich die Thyronine an das Serumalbumin, nach DiSTEFANO (25) sind etwa 50% des T_3 , sowie 13% des T_4 an das Serumalbumin gekoppelt.

Eine Freisetzung der Jodthyronine aus ihrer Trägerproteinbindung läßt sich durch physiko-chemische Methoden (Exkretion mit Äthanol, Änderung des pH-Wertes, Erhitzung) wie auch durch verschiedene als Bindungskonkurrenten fungierende Pharmaka und chemische Substanzen erreichen (94). Dieses Verhalten hat man sich für analytische Verfahren zur Bestimmung der Serumkonzentrationen zunutze gemacht; zum Beispiel kompetitive Proteinbindungsanalyse, Radioimmunoassay, Enzymimmunoassay.

Die Proteinbindung der Schilddrüsenhormone schützt diese vor dem sofortigen Abbau sowie der Exkretion. So kommt es zu einer relativ langen Halbwertszeit des Thyroxins und Trijodthyronins (6-7 Tage bzw. bis zu 2 Tagen).

Nur 0,03% des T_4 liegen als freies T_4 vor. Die Bindung des T_3 und des rT_3 an die Transportproteine ist schwächer, so daß ca 0,3% dieser Thyronine in freier Form vorliegen (15, 92). Die freien Hormonanteile stehen mit dem an Eiweiß gebundenen Anteil nach dem Massenwirkungsgesetz im Gleichgewicht.

Der biologische Effekt der verschiedenen Schilddrüsenhormone ist unterschiedlich in Stärke und Spezifität der Stoffwechselaktivität. Die größte biologische Aktivität besitzt das T_3 (86). Glukose-Utilisation, Lipolyse, Kalorigenese, Proteinsynthese, Entwicklung und thyreotrope Hypophysenfunktion werden vom T_3 am stärksten beeinflusst (20, 74, 86), T_4 besitzt generell nur einen Bruchteil der T_3 -Aktivität

(maximal 20%), der zumindest teilweise noch auf eine am Zielort stattfindende Konversion des T_4 zum T_3 zurückzuführen ist (34, 53, 68). Für das reverse Trijodthyronin konnten keinerlei thyreomimetische Aktivitäten nachgewiesen werden (53); die wesentliche Bedeutung des reverse T_3 liegt wahrscheinlich in der Hemmung der T_4 zur T_3 -Konversion. Außerdem hemmt reverse T_3 die lipolytische Aktivität des T_3 (42).

Obwohl das T_3 das biologisch aktivste Schilddrüsenhormon ist, setzt sich die gesamte thyreomimetische Aktivität aus der Summe der verschiedenen Wirkungen der einzelnen Schilddrüsenhormone zusammen. Die Hauptorte der Schilddrüsenhormon-Wirkung sind der Zellkern und die Mitochondrien. Durch Transkription werden das Wachstum, die Differenzierung und trophische Funktionen über die Mitochondrien Energieproduktion und Thermogenese reguliert (84).

Neben diesen drei Hormonen zirkulieren im Blut geringe Mengen Jodid, sowie möglicherweise Spuren von Jodtyrosinen und Thyreoglobulin, welche die Bindungsverhältnisse der Schilddrüsenhormone aber nicht beeinflussen.

1.1.4 Abbauewege der Schilddrüsenhormone in der Peripherie

Der überwiegende Teil der Jodthyronine wird durch sequentielle Monodejodierung metabolisiert. Thyronin wird entweder durch Monodejodination am äußeren phenolischen Ring (β -Ring) zu T_3 oder durch Monodejodierung am inneren Tyrosylring (α -Ring) zu rT_3 umgewandelt. Die extrathyreoidale Bildung von T_3 und rT_3 wurde ursprünglich als Folge eines statistisch zufälligen Dejodierungsprozesses angesehen. In vivo- und in vitro-Untersuchungen wiesen jedoch darauf hin, daß die Existenz zweier unabhängiger T_4 -Abbauewege und das Vorliegen eines enzymatisch gesteuerten Schaltmechanismus wahrschein-

licher ist (18, 42, 53).

Als Folgeprodukte der Monodejodierung der beiden Trijodthyronine T_3 , beziehungsweise rT_3 , entstehen die drei isomeren Dijodthyronine $3,5-T_2$, $3,3'-T_2$ und $3',5'-T_2$. $3,5-T_2$ kann ausschließlich durch β -Ring Dejodierung von T_3 entstehen. Obwohl wenig über dieses Folgeprodukt bekannt ist, läßt sich mit CHOPRA (17) vermuten, daß $3,5-T_2$ als Zwischenprodukt des metabolischen T_3 -Abbaues auftritt.

Hauptsächlich rT_3 , aber auch T_3 , werden durch periphere Dejodierung überwiegend zu $3,3'-T_2$ umgewandelt (31).

$3',5'-T_2$ kann ausschließlich durch α -Ring Dejodierung von rT_3 entstehen (71).

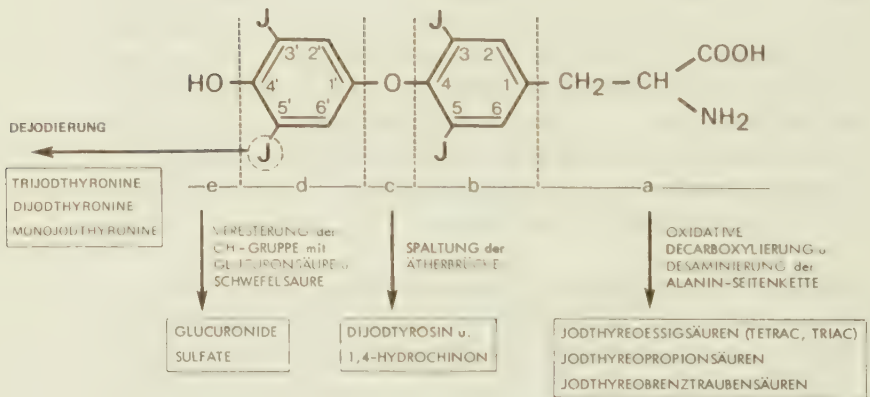
Über die Folgeprodukte der Dejodination der Dijodthyronine $3-T_1$ und $3'-T_1$ ist nur wenig bekannt. Das $3'-T_1$ konnte als Abbauprodukt von exogenem ^{125}J -markiertem T_3 , beziehungsweise rT_3 , chromatographisch identifiziert werden (71). Über das Vorkommen von $3-T_1$ liegen bis heute keine Informationen vor. Das unsubstituierte Thyroninskelett T_0 konnten PITTMAN u. CHAMBERS (66) im Urin von Ratten, die kohlenstoffmarkiertes T_0 erhalten hatten, nachweisen.

Weiterhin können Jodthyronine durch Ätherbrückenspaltung zu Dijodtyrosin und 1,4-Hydrochinon aufgespalten werden (99). In der Niere werden Jodthyronine in geringer Konzentration durch oxidative Desaminierung und Decarboxylierung inaktiviert. Es entstehen die Metaboliten Tetra- und Trijodthyreoacetat.

In der Leber erfolgt der Abbau des Thyroxins und Trijodthyronins außerdem durch Veresterung der phenolischen Hydroxylgruppe unter Bildung von Glucuroniden und Sulfaten mit biliärer Exkretion. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, daß wenige, vielleicht keine Konjugate wieder aus dem menschlichen Gastrointestinaltrakt reabsorbiert werden. Es besteht also im Gegensatz zu früheren Annahmen kein enterohepatischer

Kreislauf für Schilddrüsenhormone. Offensichtlich werden diese Konjugate im Verlauf der Darmpassage bakteriell oder hydrolytisch aufgespalten, denn in den Faeces lassen sich nur unkonjugierte Formen nachweisen (30). Eine Übersicht über die Angriffspunkte der unterschiedlichen Abbauewege am Jodthyroninskelett gibt Abbildung 3.

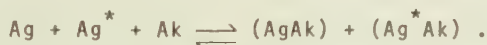
Abb.3: Schematische Darstellung der Thyroxinabbauewege



1.2 Theoretische Grundlagen der Hormonanalyse mittels des Radioimmunoassays

Erst seit radioimmunologische Hormonbestimmungen zur Verfügung stehen, ist es möglich geworden, die Hormonkonzentrationen in den verschiedenen physiologischen Funktionszuständen systematisch zu untersuchen. BERSON u. YALOW (4) sowie EKINS (28) konnten nachweisen, daß das Prinzip des kompetitiven Bindungsverhaltens, wie es aus der Enzymkinetik bekannt ist, auch auf die Antigen-Antikörper Wechselwirkung anwendbar ist.

Der Radioimmunoassay ist die Kombination einer Radioisotopenverdünnungsanalyse mit einer immunologischen Reaktion. Der Vorteil dieser Technik gegenüber chemischen, immunologischen oder biologischen Testverfahren ist die erheblich größere Empfindlichkeit - bis 10^{-15} - molare Substratkonzentrationen. Der Radioimmunoassay beruht auf dem Prinzip der kompetitiven Bindung zweier identischer Substratmoleküle (Ag) um die Bindungsstelle auf dem Antikörper (Ak), wobei das eine Antigen radioaktiv markiert ist (Ag^*), das andere Antigen (Ag) nicht. Dieser Vorgang ist reversibel und unterliegt damit dem Massenwirkungsgesetz:



Werden die Konzentrationen des markierten Antigens und des Antikörpers konstant gehalten, so nimmt bei zunehmender Konzentration des unmarkierten Antigens der radioaktiv markierte Anteil des Antigen-Antikörper-Komplexes entsprechend ab (58).

Zur quantitativen Auswertung der Meßdaten ist die Erstellung einer Eichkurve/Standardkurve erforderlich. Hierzu werden steigende Mengen unmarkierter Substanz mit konstanten Mengen von Antikörper und radioaktiv markiertem Antigen inkubiert. Nach Trennung des am Antikörper gebundenen vom

ungebundenen Antigen und der Messung der Radioaktivität im Ag^* -Ak-Komplex erhält man eine hyperbelförmige Standardkurve, die sich aus dem Anteil an gebundenem, markiertem Antigen und der dazugehörigen bekannten Konzentration an Standardantigen ermitteln läßt.

Zur quantitativen Messung von Schilddrüsenhormonkonzentrationen in den Gewebehydrolysaten beziehungsweise Seren werden neben den Standardproben mit Antigenkonzentration Hydrolysat- beziehungsweise Serumproben in den Ansatz gegeben und unter gleichen Bedingungen inkubiert. Nach Trennung des Ag^* -Antikörperkomplexes vom freien Antigen wird der Anteil der antikörpergebundenen Radioaktivität gemessen und durch Vergleich mit der Standardkurve die zugehörige Hormonkonzentration abgelesen.

1.3 Voraussetzung für die technische Durchführung eines Radioimmunoassays

Erste Voraussetzung für einen Radioimmunoassay ist das Vorliegen eines hochgereinigten Hormons, welches als Antigen zur Immunisierung eingesetzt werden kann. Da Schilddrüsenhormone keine immunogenen Eigenschaften (zu niedriges Molekulargewicht) besitzen, müssen sie zur Induzierung einer Immunantwort an großmolekulare Trägerproteine gekoppelt werden. Voraussetzung für die Gewinnung von Antikörper gegen menschliche Proteohormone ist ihre Artspezifität, das heißt, die Struktur der Proteohormone bei verschiedenen Spezies ist nicht identisch. Sie müssen als artfremd vom Tier erkannt werden, um die Bildung spezifischer Antikörper anregen zu können. Zur Immunisierung werden Kaninchen bevorzugt. Um die Bildung einer möglichst großen Antikörpermenge zu provozieren, wird das Antigen mehrmals injiziert. Daraufhin er-

folgt die Bildung von Antikörpern in den Zellen des lymphoretikulären Systems. Vor Einsatz muß der sogenannte Titer bestimmt werden, weiterhin müssen die Kreuzreaktionen des Antikörpers mit anderen Substanzen als dem Antigen beachtet werden.

Wichtig ist außerdem ein hochgereinigtes radioaktiv markiertes Antigen mit hoher spezifischer Aktivität. Schilddrüsenhormone werden in der Regel mit ^{125}J od markiert. Zur Steigerung der Nachweisempfindlichkeit wird eine möglichst hohe spezifische Radioaktivität angestrebt. Das bedeutet, daß möglichst viele Moleküle radioaktiv markiert werden, so daß bei geringer Konzentration eine hohe Zählausbeute gewährleistet ist.

Letzte Voraussetzung ist ein geeignetes Verfahren zur Trennung des freien vom antikörpergebundenen Antigen. Wir benutzten die Doppelantikörpermethode, das heißt, daß der Antigen-Antikörper-Komplex durch Bindung an einen zweiten Antikörper aus dem Reaktionsgemisch ausgefällt wurde.

1.4 Problemstellung

Die Auswirkungen durch abgestufte Jodmangelalimentation auf die Schilddrüse wurden erstmals 1966 von STUDER u. GREER (85) untersucht. Sie stellten fest, daß unter strenger Jodrestriktion das Schilddrüsenengewicht ansteigt, das PBJ abnimmt und das Verhältnis der Tracer-Jodid-Verteilung sich zugunsten des T_3 verändert. In weiteren Studien konnte gezeigt werden, daß trotz gesunkenem PBJ die Wachstumsrate der jodinsuffizienten Ratten normal blieb sowie keine Veränderungen im O_2 -Verbrauch oder bei der Regulation der Körpertemperatur eintraten (33). Die Verschiebung der intrathyreoidal markierten Jodthyronine von T_4 zu T_3 als Antwort auf die Jodrestriktion sowie das Konstanterhalten des T_3 -Serumwertes bei stark er-

niedrigten T_4 -Serumwerten, hat zu der Annahme geführt, daß die jodinsuffiziente Ratte, um ihren euthyreoten Zustand zu erhalten, bevorzugt T_3 in der Schilddrüse synthetisiert und an die Peripherie abgibt (1). ABRAMS u. LARSEN (1) publizierten erstmals 1973 quantitative Konzentrationswerte für T_3 und T_4 im Schilddrüsengewebe sowie im Serum jodmangelernährter Ratten.

Die in den letzten Jahren erfolgte Entwicklung radioimmunologischer Analyseverfahren für rT_3 , $3,3'$ - T_2 , $3',5'$ - T_2 und DIT ermöglichte es, weitere quantitative Untersuchungen über die Veränderungen der Jodaminosäurekonzentrationen unter Jodmangel und Jodüberschuß durchzuführen und die Ergebnisse früherer Relativmessungen zu ergänzen.

In der vorliegenden tierexperimentellen Arbeit sollte durch vergleichende Untersuchung der Konzentrationsverhältnisse der Jodthyronine sowie des DIT im Schilddrüsengewebe und der Thyroninkonzentrationen im Serum die bisher getroffenen Aussagen zu den Auswirkungen einer Joddiät überprüft werden. Die Ergebnisse sollen dazu beitragen, das Verständnis vom intra- und extrathyreoidalen Hormonmetabolismus zu erweitern.

2 MATERIAL und VERSUCHSTIERE

2.1 Material

Jodaminosäuren

L-Thyroxin (T_4), 3,5,5'-Trijodthyronin (T_3), 3,3',5'-Trijodthyronin (rT_3), 3,3'-Dijodthyronin ($3,3'-T_2$), 3',5'-Dijodthyronin ($3',5'-T_2$), 3'-Monojodthyronin ($3'-T_1$), 3,5-Dijodtyrosin (DIT).

Die aufgeführten Jodaminosäuren wurden in hochreiner Präparation von der Firma HENNING, Berlin GmbH, bezogen.

Radioaktive Substanz

Das zur Markierung der Jodthyronine, -tyrosin erforderliche ^{125}Jod wurde von der Firma AMERSHAM-BUCHLER (IMS 30) bezogen. Die Radiojodierung sämtlicher oben genannter Jodaminosäuren erfolgte im eigenen Labor in Anlehnung an die Methode von MEINHOLD u. SÜRJE (55).

Antiserum

Die Antiseren gegen die einzelnen Jodthyronine und Dijodtyrosin wurden mit Ausnahme von $3',5'-T_2$ durch eigene Immunisierung von Kaninchen erzeugt.

Das Antiserum gegen $3',5'-T_2$ (H128) wurde uns freundlicherweise von Dr. M. HOFNER (Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

Reagenzien

Natrium-hydrogenphosphat-12-hydrat	Fa. MERCK Darmstadt
Natrium-disulfit	" "
Chloramin T (Trihydrat)	" "
Natrium-acid	" "
5,5-Diäthylbarbitursäure	" "
Toluol	" "
TRIS(hydroxymethyl)-aminomethan	" "

Kaliumjodid	Fa.MERCK Darmstadt
Ammoniak	" "
Hexan	" "
iso-Amylalkohol	" "
n-Butanol	" "
Eisessig	" "
Perchlorat (Irenat®)	Troponwerke Köln
Pronase	Serva Biochemie Heidelberg
8-Anilinonaphthalein-1-sulfonsäure	Eastman Kodak Co. USA
Rinderserumalbumin	Behring-Institut
Präcipitationsserum	Wellcome
Normalkaninchenserum	Eigenproduktion
1-Mercapto-1-methyl-imidazol	wurde uns freundlicherweise von der Fa.HENNING Berlin GmbH überlassen.

Pufferrezepte

TRIS-Puffer:	0,03 mol/l, pH 8,6
Barbitalgrundpuffer:	0,08 mol/l, pH 8,6
Barbitalpuffer I:	0,2 % Rinderserumalbumin (BSA) 0,02 % Na-acid in Barbital-Grundpuffer
Phosphatpuffer:	0,5 mol/l, pH 7,5.

Zusammensetzung der papierchromatographischen Laufmittelsystems

Die Jodthyronine wurden in einem Laufmittel, bestehend aus iso-Amylalkohol, Hexan sowie 2 mol Ammoniak in einem Verhältnis 5:1:5 aufgetrennt (55).

Die Trennung der markierten Tyrosine erfolgte in einem sogenannten Partridge-Gemisch (38), bestehend aus n-Butanol, Eisessig und Wasser in einem Verhältnis von 4:1:5.

2.2 Versuchstiere

Jodmangel

Als Versuchstier diente in den vorliegenden Experimenten die weiße Ratte. Es wurden nur weibliche Tiere des Stammes Wistar Strain (Lieferant: NUS-Rattus Brunntal) verwendet. Bei Versuchsbeginn wogen die Tiere durchschnittlich 200 - 300 g. Alle Tiere wurden unter gleichen konstanten äußeren Bedingungen gehalten. Als mittlere Trinkmenge pro Tier und Tag ermittelten wir 15 ml, die im Mittel pro Tier und Tag verbrauchte Futtermenge lag bei ungefähr 10 g. In Tabelle 1 ist die Jodzufuhr der einzelnen Kollektive aufgelistet.

Tab.1: Versuchstierhaltung
Schematische Darstellung der Jodmangeldiäten (LID)

Gruppe	Jodzufuhr	Expositionsdauer
Ia	Kontrollgruppe normales Rattenfutter ca 15 µg Jodid/d Leitungswasser	10 Wochen
IIa	LID destilliertes Trinkwasser + 7,5 µg Jodid/d	10 Wochen
IIIa	LID destilliertes Trinkwasser	10 Wochen
IVa	LID destilliertes Trinkwasser + 4 µg Perchlorat/d	10 Wochen
Va	LID destilliertes Trinkwasser 0,8 µg Jodid/d i.p.	10 Wochen während der letzten 14 Tg.
VIa	LID destilliertes Trinkwasser 15 µg Jodid/d	10 Wochen während der letzten 14 Tg.

Gruppe Ia fütterten wir mit der "Haltungsdiät für Ratten und Mäuse-1320" der Fa.ALTRONIN, um ein Vergleichskollektiv zu erhalten. Das Normalfutter wies einen Jodgehalt von 1,5 mg pro kg Futter auf; die Tränkung erfolgte mit Leitungswasser.

Die Fütterung der Gruppen IIa - VIa erfolgte mit der jod-armen Altromin-Sonderdiät C 1042. Eine direkte Bestimmung des Jodgehaltes in der Jodmangeldiät (low-iodine diet, LID) konnte bisher nicht vorgenommen werden. Der aktuelle rechnerische Wert wurde von der Fa.ALTRONIN mit $3 \mu\text{g J}^-/\text{kg}$ Futter angegeben. Die Tränkung der Tiere erfolgte mit destilliertem Wasser, um eine unkontrollierte Jodaufnahme zu verhindern. Gruppe IIIa erhielt über 10 Wochen die Jodmangelnahrung C 1042 und destilliertes Trinkwasser; Gruppe IVa behandelten wir mit einem Thyreostatikum; wir versetzten das destillierte Trinkwasser dieses Kollektivs mit Natriumperchlorat (Irenat®), das ein sehr potenter Inhibitor des Jodidtransportes ist. Es wirkt einerseits, indem es die unidirektionale Clearance senkt, andererseits den Efflux des Jodids steigert. Es führt zu einem sehr ausgeprägten intrathyreoidalen Jodmangel, wirkt somit synergistisch zur LID-Alimentation und beeinträchtigt zusätzlich die Schilddrüsenhormonsynthese. Die Dosierung des Thyreostatikums wählten wir in Abhängigkeit zur menschlichen Dosis bei Hyperthyreose, die mit 1-1,5 g/d bis zum Erreichen der Euthyreose angegeben wird. Entsprechend versetzten wir das Trinkwasser der Ratten mit $0,27 \mu\text{g}$ Perchlorat/ml H_2O , wodurch sich bei 15 ml Wasserverbrauch eine tägliche Perchloratzufuhr von $4 \mu\text{g}$ pro Tier ergab.

Wir substituierten drei Kollektive unterschiedliche Dosen Kaliumjodid, um nachzuweisen, daß die Auswirkungen auf die Schilddrüsenhormonkonzentrationen durch den Jodmangel induziert wurden. Die Gruppe IIa erhielt während der ganzen Fütterungsperiode LID; dem destillierten Trinkwasser fügten wir $0,65 \mu\text{g}$ KJ/ml hinzu. Das entsprach bei einem täglichen

Wasserverbrauch von 15 ml einer Jodidzufuhr von 7,5 µg pro Tier. Diese Gruppe sollte in Anlehnung an TAUROG und Mitarbeiter (91) unser künstliches Normalkollektiv werden. Gruppe Va und VIa erhielten ebenfalls über 10 Wochen die Jodmangeldiät plus destilliertes Trinkwasser. In den letzten zwei Wochen vor dem Tötungsdatum erhielten sie zusätzlich täglich eine Intraperitonealinjektion mit Kaliumjodidsuspension.

Jodüberschuß

Die Auswirkungen eines Jodüberangebotes auf die Schilddrüse wurden in einem zweiten Experiment untersucht. Als Versuchstier diente wiederum die weiße Ratte des gleichen Tierstammes. Bei Versuchsbeginn wogen die Tiere 180 - 225 g. Alle Tiere wurden unter gleichen konstanten äußeren Bedingungen gehalten. Tabelle 2 zeigt eine Übersicht der täglichen Jodaufnahme der einzelnen Versuchsgruppe.

Tab.2: Schematische Darstellung der Jodüberschußdiäten

Gruppe	Jodzufuhr	Expositionsdauer
Ib	Kontrollgruppe normales Rattenfutter (NID)* ≡ 15 µg Jodid/d und Leitungswasser	2 Wochen
IIb	NID + 125 µg Jodid/d in Leitungswasser	2 Wochen
IIIb	NID + 660 µg J ⁻ /d in Leitungswasser	2 Wochen
IVb	NID + 2000 µg J ⁻ /d in Leitungswasser	2 Wochen

* NID = normales Jodfutter (normal iodine diet)

Die Tiere erhielten über 14 Tage die Haltungsdiät für Ratten und Mäuse - 1320 der Fa. ALTROMIN. Der Jodidgehalt dieses Normalfutters wurde von der Firma mit 1,5 mg Jodid pro Kilogramm angegeben. Bei einer geschätzten Futtermenge von ca 10 g täglich entsprach dieses einer Jodzufuhr von ca 15 µg Jodid pro Tier und Tag. Da die Tränkung mit Leitungswasser erfolgte, wurden noch zusätzlich geringe Mengen Jodid aufgenommen. - Die Gruppe Ib, ernährt und getränkt wie oben beschrieben, war die Kontrollgruppe dieses Experimentes. Das Trinkwasser der Gruppe IIb versetzten wir mit einer relativ niedrigen Joddosis mit 125 µg Jodid/dl; die Gruppe IIb erhielt einen mittleren Jodüberschuß von 660 µg Jodid/d; die Gruppe IVb wurde exzessiv mit Jodid versorgt, d.h. 2000 µg Jodid/d.

Nach den zehn bzw. zwei wochen dauernden Fütterungsperioden wurde den Tieren unter Pentobarbitalnarkose durch intrakardiale Punktion das Blut entnommen und anschließend die Schilddrüse herausoperiert. Die Schilddrüsen wurden sofort gewogen und einzeln in 300 µl 0,03 mol/l TRIS-Puffer tiefgefroren. Das Rattenblut wurde zentrifugiert, das Serum abpipettiert und ebenfalls bei -20°C eingefroren.

3 METHODEN

3.1 Aufarbeitung der Rattenschilddrüsen

Die proteolytische Verdauung von Schilddrüsenhomogenaten ist eine häufig angewendete Methodik zur Freisetzung der einzelnen Jodaminosäuren aus ihrer kovalenten Bindung im Thyreoglobulin. Nach der enzymatischen Aufspaltung lassen sich dann die Konzentrationen der Jodthyronine und Jodtyrosine im Hydrolysat mit geeigneten radioimmunologischen Verfahren bestimmen. Die proteolytische Aufarbeitung der Rattenschilddrüsen erfolgte nach der von INOUE u. TAUROG (44) beschriebenen Methode unter anaeroben Bedingungen mit Pronase als Verdauungsenzym. Die Aufarbeitungsschritte sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

Tab.3: Die proteolytische Aufarbeitung von Rattenschilddrüsen

I Homogenisierung der Schilddrüse
1. Schilddrüse + 300 µl TRIS-Puffer (0,03 mol/l) in Homogenisator überführen 2. 50 µl $^{125}\text{J-T}_3$-Tracerlösung hinzugeben (ca 4 uCi $^{125}\text{J} \approx 4000 - 5000 \text{ cpm}$) 3. 2 min pottern 4. Homogenat in Plastikröhrchen überführen 5. Homogenisator 2 mal mit 100 µl TRIS-Puffer spülen
II Hydrolyseansatz (in Penicillingläschen)
1. 250 µl Homogenat 250 µl TRIS-Puffer (0,03 mol/l) + 0,11 mol/l MMI 50 µl Pronase (3,5%) 1 Tropfen Toluol 2. evakuieren, mit Stickstoff überschichten 3. 18 h, 37°C, Wasserbad, Schüttelstufe 3 4. Hydrolysat in Polystyrolröhrchen überführen, 1 Glas 2 mal mit 250 µl TRIS-Puffer spülen 5. Hydrolysat zentrifugieren, 1 ml Überstand abpipettieren 6. Zählrate ermitteln 7. bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C aufbewahren

Im einzelnen wurde wie folgt verfahren:

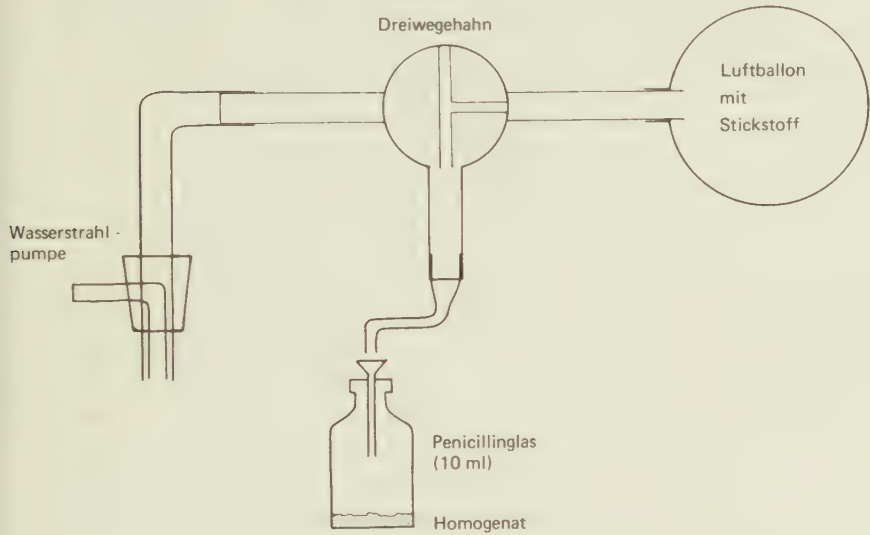
Die in 300 μ l TRIS-Puffer vorliegenden Schilddrüsen wurden einschließlich der Pufferlösung in Potterglashomogenisatoren überführt und mit 50 μ l $^{125}\text{J-T}_3$ -Tracerlösung (ca 4 $\mu\text{Ci }^{125}\text{J}$, entsprechend 4000 bis 5000 cpm) versetzt. Es wurde ca zwei Minuten homogenisiert, das Homogenat in Polystyrolröhrchen überführt und das Potter-Gefäß zweimal mit 100 μ l TRIS-Puffer gespült, so daß im Mittel 94% der Schilddrüse als Homogenat zur weiteren Aufarbeitung vorlagen.

Der Hydrolyseansatz erfolgte in verschließbaren Penicillin-gläschen. Ein Homogenataliquod wurde zu gleichen Teilen mit 0,03 mol/l TRIS-Puffer und 0,11 mol/l 1-Methyl-1-mercaptoimidazol (MMI) versetzt; als Verdauungsferment wurde 50 μ l Pronase-Lösung (3,5% in destilliertem Wasser) und ein Tropfen Toluol hinzugegeben. Danach erfolgte die Evakuierung und Stickstoffbeladung der Proben, wie in Abbildung 4 dargestellt.

Zur anaeroben Hydrolyse wurden die so behandelten Proben für 18 h bei 37°C in ein Schüttelbad gestellt, am darauffolgenden Tag nach Zentrifugation der Überstand des Ansatzes gewonnen und die Zählrate des Hydrolysates ermittelt.

Zur Ausbeutebestimmung wurde die Hydrolysat-zählrate mit den Zählraten der zugegebenen Gesamttracerlösung ins Verhältnis gesetzt, wodurch sich der individuelle Schilddrüsenanteil jedes Hydrolysatansatzes errechnen ließ. Ein Berechnungsbeispiel ist in Tabelle 4 dargestellt.

Abb.4: Graphische Darstellung der Evakuierung und Stickstoffüberschichtung.



Die Evakuierung der Penicillingläschen erfolgte durch die Absaugung der Luft mittels einer Wasserstrahlpumpe, anschließend wurde durch Drehung des Dreiweghahns Stickstoff in das Penicillinglas eingesogen. Dieser Vorgang wurde 5 mal wiederholt.

Tab.4: Berechnungsbeispiel des individuellen Schilddrüsenanteils jedes Hydrolysatsatzes

Pr. Nr.	Schilddrüsen- gewicht(mg)	Gesamttracer- zahlrate(cpm)	Hydrolysat- zahlrate(cpm)	SD-Anteil/ml Hy- drolysat(mg/ml) (%)
		4689 4610 4564 4799 4485 4610		
		± 4626		
21	29,53		1545	9,86 = 33,4 %
22	41,67		1441	12,98 = 31,2 %
23	37,28		1558	12,56 = 33,7 %

Zur späteren radioimmunologischen Analyse verdünnten wir die Proben mit Barbitalspuffer. Die Verdünnungsstufe wählten wir in Abhängigkeit von der Schilddrüseninsuffizienz und den damit zu erwartenden Hormonkonzentrationen. Sämtliche Proben wurden bis zur späteren Hormonanalyse bei -20°C aufbewahrt.

3.2 Ausführung der radioimmunologischen Bestimmung der Jodaminosäure in den Schilddrüsenhydrolysaten und im Serum

Die Methoden der in dieser Arbeit angewendeten radiochemischen Bestimmungsverfahren für T_4 und T_3 sowie rT_3 , $3,3'$ - T_2 und DIT wurden bereits in früheren Arbeiten dargestellt (50, 51, 52, 54, 56). Das Bestimmungsverfahren für den $3',5'$ - T_2 -Assay wird in den Kap.3.4 und 4.1.5 dieser Arbeit beschrieben. Die Pipettier - und Inkubationsschritte waren für alle oben aufgeführten Radioimmunoassays identisch und wurden wie folgt durchgeführt:

Als Inkubationsmedium sämtlicher Assays diente der Barbitalpuffer I (s.Kap.2). Sämtliche Verdünnungen der eingesetzten Hydrolysate und Seren erfolgten in diesem Puffersystem. Die Inhibierung der Schilddrüsenhormonbindung an Serumbindungsproteine, speziell thyroxinbindendes Globulin (TBG) erfolgte durch 8-Anilinonaphthalin-1-sulfonsäure (ANS) zur Tracerlösung. Sämtliche Proben wurden als Triplikate angesetzt; 50 μ l der jeweiligen Probenverdünnung wurden zusammen mit 100 μ l Tracerlösung, 100 μ l Antiserum und 350 μ l Barbitalpuffer I in Polystyrolröhrchen pipettiert. Für die Erstellung der Standardkurven wurden Verdünnungsreihen der jeweiligen Standardlösung in Barbitalpuffer I hergestellt. Bei den Ansätzen zur Konzentrationsbestimmung der Hydrolysate wurde den Standardproben TRIS-Puffer mit MMI in gleichen Volumina wie bei Messung der Hydrolysatproben zugesetzt; in den Serumassays wurde den Standardproben zu gleichen Teilen hormonfreies Rattenserum zugesetzt, das durch Aktivkohlebehandlung von normalem Rattenserum entsprechend der Vorschrift von MITSUMA und Mitarbeitern (57) hergestellt worden war. Um das Endinkubationsvolumen von 600 μ l zu erhalten, pipettierten wir 300 μ l Barbitalpuffer, 100 μ l Tracerlösung und 100 μ l Antiserum in jedes Röhrchen. Zur Bestimmung der Gesamtaktivität wurden 100 μ l Tracerlösung in Polystyrolröhrchen pipettiert.

Für die Ermittlung des Blanks wurden zu 50 µl 0,03 mol/l TRIS-Puffer mit 0,05 mol/l MMI, 50 µl Barbitalpuffer I und 100 µl Tracerlösung gegeben.

Nach einer Vorinkubationszeit von drei bis vier Stunden bei Raumtemperatur wurde das Präzipitationsserum (2. Antikörper) in der für das jeweilige Hormon ermittelten Verdünnung hinzupipettiert und über Nacht weitere 16-20 Stunden bei Raumtemperatur stengelassen.

Bis auf die Gesamtaktivitätsröhrchen wurden am folgenden Tag alle Proben mit 1 ml destilliertem Wasser versetzt und 20 Minuten bei 4°C mit 2500 x g zentrifugiert. Der Oberstand wurde abgesaugt, der Waschvorgang nochmals wiederholt.

Die Radioaktivitätsmessung des Präzipitates erfolgte in einem Gammaprobenwechsler. Tabelle 5 gibt die Arbeitsvorschrift wieder, nach der alle Hormonbestimmungen dieses Experimentes durchgeführt wurden.

3.3 Serumextraktion von 3,3'-T₂

Die störenden Einflüsse der T₃-Kreuzreaktivität (0,31%) bei erwartungsgemäß niedrigen 3,3'-T₂ Konzentrationen im Serum erforderte eine besondere Probenvorbereitung für diesen Serumassay. 400 µl gepooltes Rattenserum wurde mit 800 µl Ethanol (97%ig) extrahiert und nach einer 20minütigen Inkubationszeit zentrifugiert. 300 µl des Oberstandes wurden unter Luftstrom eingetrocknet. Das so eingeengte Serum (≈100 µl Serum pro Inkubationsröhrchen) wurde - wie unter 3.2 beschrieben - zum Assay eingesetzt.

Tab. 5: Arbeitsvorschrift für die radioimmunologische Bestimmung von Jodthyroninen

Lösungen

1. Puffer 0,08 m Barbitalpuffer pH 8,6
 0,2 % Rinderserumalbumin (BSA)
 0,02 % Na-acid
2. Tracer-Lösung 50 ml Puffer I
 X ml Normalkaninchenserum
 X ml ANS (nur in den Serumassays)
 markiertes Antigen
3. Standard-Lsg. Verdünnungsreihe der einzelnen Thyronine
 in den bekannten Konzentrationen
4. Antiserum Die jeweiligen Abfüllungen in 50 ml
 Puffer I lösen
5. Präzipitations- (2.Antikörper)
 serum Verdünnung 1:X

Pipettierschema

<u>Unspezifische Bindung</u>		Hydrolysate bzw. Seren
50 µl	TRIS-Puffer+MMI im Hydrolysat- ansatz bzw. hormonfreies Rattenserum im Serum	50 µl Hydrol.bzw. Serum
450 µl	Puffer I	350 µl Puffer I
100 µl	Tracerlösung *	100 µl Antiserum *
		100 µl Tracerlösung *
<u>Standardkurve</u>		
50 µl	hormonfreies Serum bzw. TRIS-Puffer + MMI	
50 µl	Puffer I	
50 µl	Standard-Lösung	
250 µl	Puffer I	
100 µl	Antiserum *	
100 µl	Tracer-Lösung	

4 Stunden bei Raumtemperatur stehenlassen, dann 100 µl Präzipitationsserum zugeben, weitere 16-20 Stunden stehenlassen

3.4 Entwicklung eines Radioimmunoassays für 3',5'-Dijodthyronin

Die Entwicklung spezifischer Assays für T_4 , T_3 , rT_3 und $3,3'-T_2$ hat das Verständnis der Physiologie dieser Hormone gefördert. Weil bekannt ist, daß markiertes rT_3 in vivo zu 3',5'-Dijodthyronin ($3',5'-T_2$) abgebaut werden kann (71), und da von CHOPRA (18) vermutet wurde, daß $3',5'-T_2$ metabolisch aktiv ist (es inhibiert die Konversion von T_4 zu T_3 in Rattenleberhormogenaten), schien es uns notwendig zu sein, die Untersuchungen in den Schilddrüsenhydrolysaten um die quantitative Bestimmung des $3',5'-T_2$ Gehaltes zu erweitern; deshalb entwickelten wir einen Radioimmunoassay für das Dijodthyronin $3',5'-T_2$.

3.4.1 Herstellung von ^{125}J -markiertem 3',5'-Dijodthyronin

Die Herstellung von ^{125}J -markiertem $3',5'-T_2$ erfolgte in Anlehnung an die Methode von MEINHOLD u. SÖRJE (55). Als Markierungssubstrat diente $3'-T_1$, das mit ^{125}J unter Verwendung von Chloramin-T als Oxidationsmittel zu ^{125}J - $3',5'-T_2$ radiojodiert wurde. Im einzelnen wurde wie folgt verfahren:

$3'-T_1$ wurde in 0,01 mol/l NaOH gelöst, Chloramin-T und Natriumdisulfit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) in 0,1 mol/l Phosphatpuffer pH 7,0. Für die Markierungsreaktion wurden die folgenden Lösungen in ein spitz zulaufendes Reaktionsgefäß (Fassungsvolumen 300 μl) pipettiert: 40 μl Phosphatpuffer, 0,5 mol/l, pH 7,5, 10 μl ^{125}J (1 mCi), 10 μl $3'-T_1$ (2 nmol) und 10 μl Chloramin-T (0,2 mol) pipettiert. Nach einer Reaktionszeit von 30 Sekunden wurden 10 μl Natriumdisulfit (1,5 mol) hinzugegeben. Das gesamte Reaktionsvolumen von 80 μl wurde auf einen Papierstreifen (Whatmann 3 MM) aufgetragen und papier-

chromatographisch im Laufmittelsystem nach BELLABARBA und Mitarbeitern (3) getrennt. Nach Lokalisation der einzelnen Peaks mit einem Papierscanner wurde der 3',5'-T₂ Peak herausgeschnitten und in Methanol mit 0,25% konz. Ammoniak eluiert. Anschließend erfolgte eine dünnschicht-chromatographische Reinheitsprüfung. Die so erhaltene Tracerlösung wurde bei -20°C aufbewahrt.

3.4.2 Titration des Antiserums

Zur Bestimmung des Antiserumtiters wurden 400 µl Barbitalpuffer I, 100 µl 3',5'-T₂ Tracerlösung und 100 µl Antiserumverdünnung (1:200 - 1:64 000) 20 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Trennung von antikörpergebundener und freier Radioaktivität erfolgte nach der üblichen Doppelantikörpertechnik (39). Die Verdünnung des Antiserums, bei der 50% des Tracers gebunden werden, wird definitionsgemäß als Titer bezeichnet (5).

3.4.3 Erstellung einer Standardkurve

Für die Erstellung einer Standardkurve lösten wir steigende Mengen 3',5'-T₂ in Barbitalgrundpuffer (3,91 fmol/50 µl - 200 fmol/50 µl). Der Ansatz erfolgte wie unter 3.2 beschrieben. Nach Radioaktivitätsmessung und Berechnung der B/B₀-Werte ergab sich eine hyperbelförmige Standardkurve.

3.4.4 Qualitätskontrolle

Zur statistischen Qualitätskontrolle des 3',5'-T₂-Assays prüften wir die Empfindlichkeit und die Reproduzierbarkeit von Testergebnissen innerhalb eines Ansatzes. Außerdem führten wir eine Wiederfindungsprüfung durch. Wir pipettierten bekannte Konzentrationen 3',5'-T₂ zu je zwei Hydrolysatproben von Normal- bzw. Jodmangeltieren. Einer Vorlage von 50 µl Normal- bzw. Jodmangelhydrolysat im Inkubationsansatz wurden jeweils Mengen von

- | | | | | | |
|----|------|-------|------|-----|-----------------------------|
| a) | 62,5 | 125 | 250 | 500 | 3',5'-T ₂ fmol/R |
| b) | 15,6 | 31,25 | 62,5 | 125 | 3',5'-T ₂ fmol/R |

hinzugefügt.

Zur Spezifitätsprüfung des Antiserums H 128 testeten wir die Kreuzreaktivität mit folgenden Verbindungen: DIT, MIT, KJ, T₄, rT₃. Steigende Konzentrationen der jeweiligen Verbindungen inkubierten wir mit konstanten Konzentrationen des Antiserums H 128. Als Maß für die Spezifität des Antikörpers dient der prozentuale molare Kreuzreaktionsindex.

$$\text{Kreuzreaktivitätsindex} = \frac{\text{Antigenkonzentration bei } B/B_0 = 50\%}{\text{Konzentration der kreuzreagierenden Substanz bei } B/B_0 = 50\%}$$

3.4.5 Experimentelle Durchführung der radioimmunologischen 3',5'-Dijodthyronin-Bestimmung

Für den Ansatz wurden die Hydrolysatverdünnungen aufgetaut. 50 µl dieser Verdünnung setzten wir im Radioimmunoassay ein, der - wie unter 3.2 beschrieben - ausgeführt wurde. Das Antiserum gegen 3',5'-T₂ setzten wir in einer Pipettierverdünnung von 1:1000 ein. Die Endverdünnung betrug bei 600 µl Inkubationsvolumen 1:6000.

4 ERGEBNISSE

4.1 Untersuchungen zur Methodik der Schilddrüsenauf- arbeitung und radioimmunologischen Konzentrations- messungen

4.1.1 Proteolytische Aufspaltung von in vivo-markierten Rattenschilddrüsen mittels Pronase

Um sicher zu gehen, daß ohne Pronasezusatz keine oder nur minimal nachzuweisende freie Schilddrüsenhormone vorkommen, führten wir eine in vivo-Markierung an zwei Ratten durch. Wir injizierten zwei weiblichen Ratten des Stammes Wistar Strain je 100 $\mu\text{Ci}^{125}\text{J}$ intraperitoneal. Nach 24 Stunden wurde den Tieren unter Pentobarbitalnarkose die Schilddrüse entnommen und - wie unter 3.1 beschrieben - homogenisiert und hydrolysiert. Vor Pronase- und MMI-Zusatz entnahmen wir dem Homogenat ein Aliquod (Abb.5), ein zweites nach dem Hydrolysevorgang (Abb.6). Die Aliquods wurden auf Papierstreifen (Whatmann 3 MM) aufgetragen, im Jodtyrosin-Laufmittelsystem (s.Kap.2) aufgetrennt und anschließend gescannt.

Wie aus der Abbildung 5 zu entnehmen ist, fand im Homogenat im Tyrosin-Laufmittelsystem keine Auftrennung statt. Das gesamte aufgetragene Material befand sich auch nach der Laufzeit am Startpunkt.

Hingegen kam es (wie Abb.6 veranschaulicht) in dem entsprechenden Hydrolysat zu einer sehr guten Auftrennung der in vivo-markierten Tyrosine und Thyronine. Nach einer Laufzeit von 18 Stunden befand sich kein Material mehr am Startpunkt. Die Tyrosine waren in einen MIT- und DIT-Anteil aufgespalten, als dritter Peak fand sich ein Jodthyroningemisch aus T_3 und T_4 .

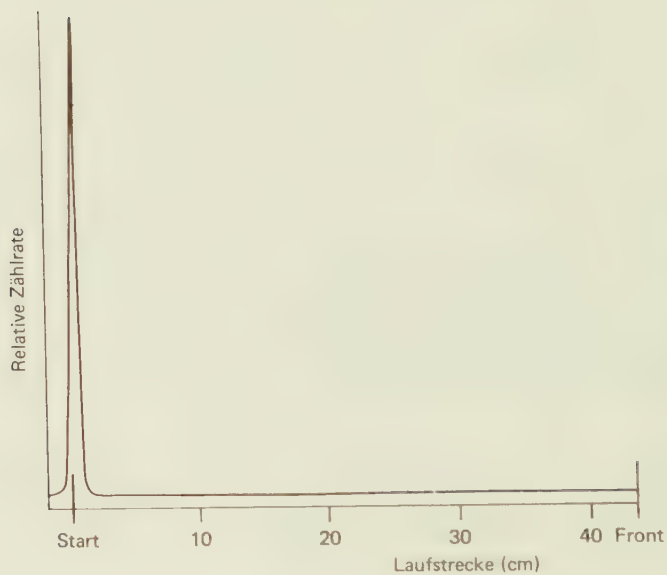


Abb.5: Papierchromatographische Auftrennung von in vivo-markierten Rattenschilddrüsenhomogenaten im Tyrosin-System

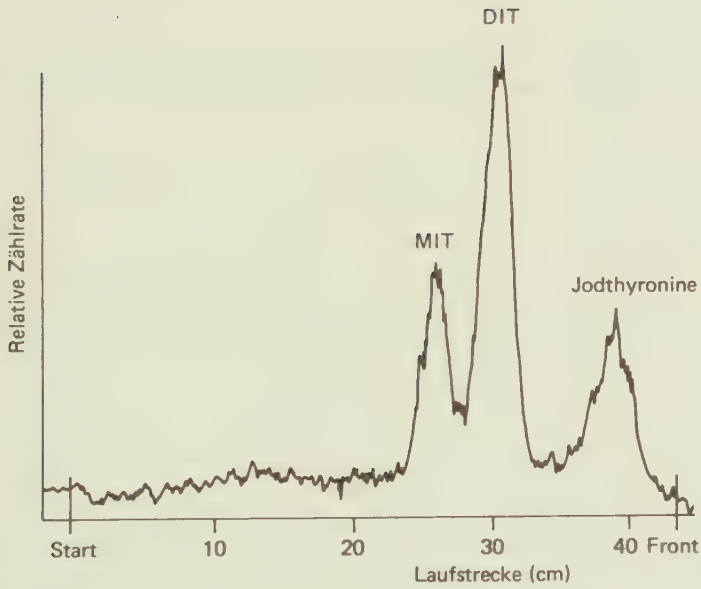


Abb.6: Papierchromatographische Auftrennung von in vivo-markierten Rattenschilddrüsenhydrolysaten im Tyrosin-System

4.1.2 Beeinflussung der Proteolyse durch 1-Methyl-1-mercapto-imidazol (MMI)

INOUE u. TAUROG (44) wiesen nach, daß die Wiederauffindungsraten für T_3 , beziehungsweise T_4 nach alleiniger aerober Pronasedigestion 40-60% betrugen. Zu diesen hohen Verlustraten kam es, weil

- Jodthyronine sofort nach der Freisetzung aus dem Thyreoglobulinmolekül durch Dejodasen dejodiert wurden und
- Jodthyronine von Eiweißfragmenten, die während des aeroben Hydrolysevorgangs entstanden, absorbiert wurden.

Die Wiederauffindungsrate von Thyroninen konnte auf 95% erhöht werden, indem die Hydrolyse der Schilddrüsenhomogenate durch Pronase unter anaeroben Bedingungen in der Gegenwart von 0,05 mol/l MMI durchgeführt wurde.

Dieses Ergebnis veranlaßte uns zu dem Experiment, den Hydrolysevorgang sowohl mit als auch ohne MMI-Zusatz durchzuführen. Wir homogenisierten 40 mg Schafschilddrüse - wie unter 3.1 beschrieben. Aus diesem Homogenatpool erstellten wir 22 Hydrolyseansätze. Zwölf Proben versetzten wir mit 0,05 mol/l MMI, zehn Proben ließen wir ohne MMI-Zusatz. Der Hydrolysevorgang geschah wie unter 3.1 beschrieben; anschließend wurden die T_3 - und T_4 -Konzentrationen radioimmunologisch gemessen.- Wie aus Tabelle 6 zu entnehmen ist, zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Hormonausbeute beider Gruppe ($p < 0,0025$). Die Ansätze mit 0,05 mol/l MMI lieferten durchschnittlich eine um 20% höhere Ausbeute als diejenigen ohne MMI-Zusatz.

Tab.6: Hydrolysatkonzentrationen von T_3 und T_4 mit und ohne MMI-Zusatz

	T_3 (pmol/mg SD)	T_4 (pmol/mg SD)
0,05 m MMI	$33,92 \pm 1,44$	$127,75 \pm 11,69$
ohne MMI	$27,50 \pm 5,74$	$101,00 \pm 24,43$

4.1.3 Einfluß der Gewebekonzentration auf die Thyroxinkonzentration

IOUNE u.TAUROG (44) wiesen nach, daß variierende Gewebekonzentrationen von 15-60 mg/ml keinen Effekt auf die T_4 -Konzentration hatte, soweit alle anderen Bedingungen konstant gehalten wurden. In unserem Experiment variierte die Gewebekonzentration von 15-50 mg/ml pro Verdauungsansatz. Innerhalb der einzelnen Kollektive war die Schwankung der Gewebekonzentration jedoch geringer. In der Tabelle 7 werden beispielhaft die T_4 -Konzentrationen dem Schilddrüsengewicht der Gruppe VIa gegenübergestellt. Es ließ sich keine Korrelation zwischen Hormonkonzentration und Gewebekonzentration herstellen, so daß die unterschiedlichen Gewebekonzentrationen pro ml Hydrolysat der einzelnen Gruppen vernachlässigt werden konnten.

Tab.7: Schwankungen der Thyroxinkonzentrationen im Verhältnis zum Schilddrüsengewicht

Pr. Nr.	SD (mg)	T ₄ (pmol/mg SD)
101	30,84	376
102	24,24	508
103	20,41	318
104	25,06	512
105	19,94	401
106	25,09	392
107	26,91	326
108	26,65	415
109	17,11	519
110	26,07	323
111	25,97	445
112	27,21	554
113	30,33	299
114	22,24	341
115	23,72	398

4.1.4 Richtigkeitskontrolle der radioimmunologischen Trijodthyronin- und Dijodtyrosin-Bestimmung

Stellvertretend für die verschiedenen Jodaminosäuren untersuchten wir, wie hoch die Wiederauffindungsrate im Hydrolysatassay für T₃ und DIT lag. Die Einzelergebnisse für den T₃-Radioimmunoassay werden in der Tabelle 8 wiedergegeben. Die Wiederauffindungsrate lag zwischen 93% und 109%. Im Mittel wurden 102% des zugegebenen T₃ wiedergefunden.

Tab.8: Wiederfindungsversuch im T₃-RIA (Hydrolysat)

Hydrolysat Nr.	T ₃ -Zugabe (nmol/l)	gefundene T ₃ - Konz.(nmol/l)	berechnete T ₃ - Konz.(nmol/l)	Wiederfin- dung (%)
63	---	0,61	---	---
	0,77	1,37	1,38	99,3
	1,16	1,83	1,77	103,4
	1,54	2,34	2,15	109,4
	2,31	2,90	2,92	99,3
64	---	0,38	---	---
	0,77	1,16	1,15	100,9
	1,16	1,44	1,54	93,5
	1,54	2,11	1,92	100,9
	2,31	2,76	2,69	102,6
21	---	2,43	---	---
	1,16	3,65	3,59	101,8
	1,54	3,93	3,97	99,0
	2,31	4,69	4,80	97,7
	3,08	5,58	5,51	101,3
22	---	1,34	---	---
	1,16	2,73	2,50	109,2
	0,77	2,19	2,11	103,8
	3,08	4,71	4,42	106,6
	4,62	5,97	5,96	100,2
Mittelwert				102,4
Standardabweichung				4,6

In der Tabelle 9 sind die Einzelergebnisse des Wiederfindungsexperimentes im DIT-Radioimmunoassay aufgelistet. Wir ermittelten Wiederfindungswerte zwischen 84 und 115%, im Mittel 97%.

Die Mittelwerte beider Wiederfindungsversuche wichen nur unwesentlich von dem theoretisch zu erwartenden Wert 100% ab, so daß nichts auf einen systematischen Fehler hinwies.

Tab.9: Wiederfindungsversuche im DIT-Radioimmunoassay (Hydrolysat)

Hydrolysat Nr.	DIT-Zugabe (pmol/R)	gefundene DIT- Konz.(pmol/R)	berechnete DIT- Konz.(pmol/R)	Wiederfin- dung (%)
61	---	0,05	---	---
	0,025	0,08	0,08	100,0
	0,05	0,11	0,10	110,0
	0,125	0,17	0,18	94,0
	0,250	0,28	0,30	93,0
62	---	0,06	---	---
	0,025	0,08	0,09	88,9
	0,05	0,11	0,11	100,0
	0,125	0,16	0,19	84,2
	0,250	0,29	0,31	93,5
81	---	0,14	---	---
	0,05	0,19	0,19	100,0
	0,125	0,31	0,27	114,8
	0,250	0,38	0,39	97,4
84	---	0,18	---	---
	0,05	0,23	0,23	100,0
	0,125	0,28	0,31	90,3
	0,250	0,40	0,43	93,0
Mittelwert				97,1
Standardabweichung				8,1

4.1.5 Charakteristika des 3',5'-Dijodthyronin-Radioimmunoassay

4.1.5.1 3',5'-T₂-Markierung

Die standardisierten experimentellen Bedingungen zur β -Ring-Markierung von Jodthyroninen mit ¹²⁵J wurden in Kap. 3.4.1 dargestellt. Als Markierungssubstrat diente 3'-T₁.

Die nach einem elektrophilen Substitutionsmechanismus ablaufende oxidative Radiojodierung führte durch Wasserstoffersatz an 5'-Position zur Bildung von markiertem 3',5'-T₂. Durch Jodisotopenaustausch in 3'-Position wurde als Nebenprodukt radioaktives 3'-T₁ gebildet. Im Gegensatz zum β -Ring verhält sich der α -Ring inert (56). Somit lagen nach der Markierung im Reaktionsgemisch zwei verschieden markierte Jodthyronine sowie nicht gebundenes radioaktives Jodid vor. Das Reaktionsgemisch wurde papierchromatographisch aufgetrennt und durch authentische Referenzsubstanzen (kaltes 3'-T₁ und 3',5'-T₂) (siehe auch Abbildungen 7 und 8) identifiziert.- Wie in Abbildung 9 veranschaulicht, fand zwar eine gute Auftrennung der Jodthyronine statt, jedoch nicht zwischen 3',5'-T₂ und Jodid. Zur Gewinnung von ausreichend reinem 3',5'-T₂ wurde nur der aus Abbildung 9 ersichtliche Anteil des Papierstreifens zur Elution eingesetzt, der dem jodfreien Bereich des 3',5'-T₂-Peaks zuzuordnen war. Wie das Dünnschichtchromatogramm in Abbildung 10 zeigt, konnte so eine 3',5'-T₂-Markierung von hoher Reinheit gewonnen werden.

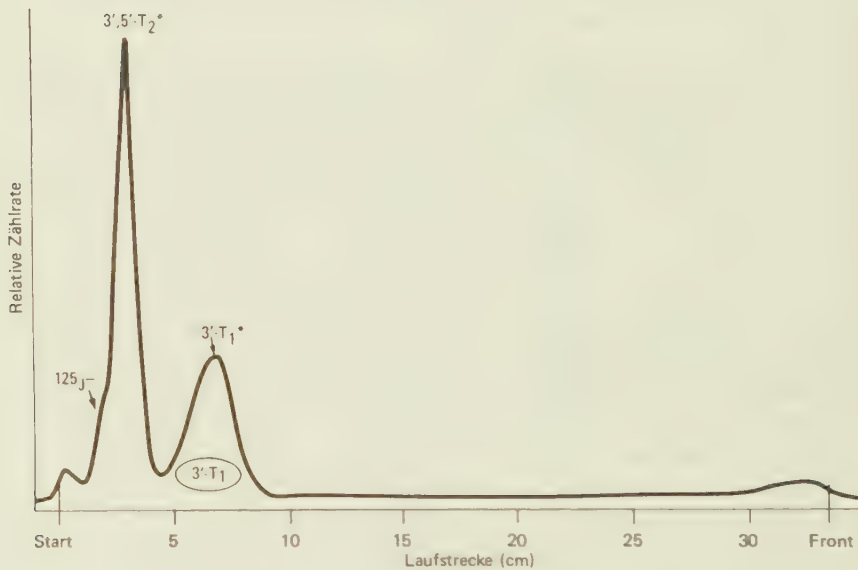


Abb.7: Analytisches Papierchromatogramm des Reaktionsgemisches nach radiojodierung von 3'-T₁.
Zur Identifizierung der Peaks wurde als Referenzsubstanz kaltes 3'-T₁ aufgetragen.

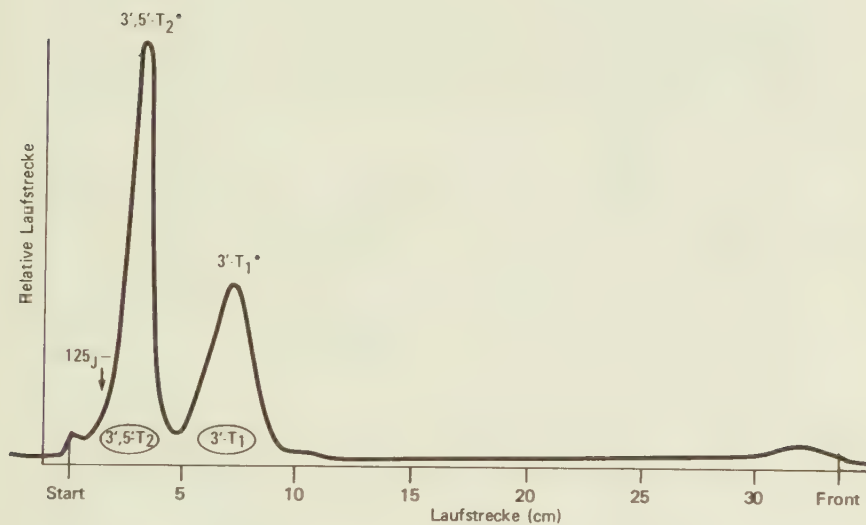


Abb.8: Analytisches Papierchromatogramm des Reaktionsgemisches nach Radiojodierung von $3'-T_1$.

Zur Identifizierung der Peaks wurde als Referenzsubstanz zusätzlich kaltes $3',5'-T_2$ aufgetragen.

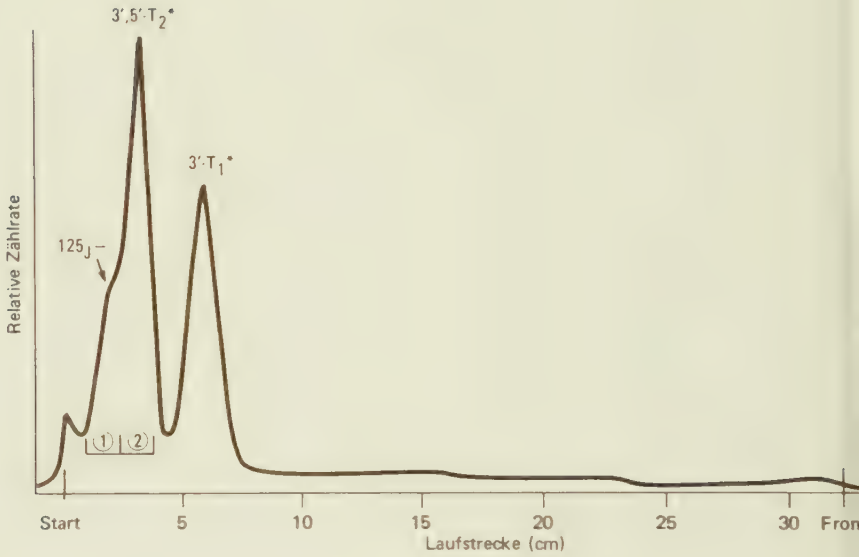


Abb.9: Präparatives Papierchromatogramm der 3',5'-T₂-Markierung

- 1) Der verworfene Anteil des 3',5'-T₂-Peaks
- 2) Der zur Elution benutzte Anteil des 3',5'-T₂-Peaks.

Abb.10:

Dünnschichtchromatographische Reinheitsprüfung von markiertem 3',5'-T₂.



4.1.5.2 Antiserumtitration

Zur Entwicklung einer leistungsfähigen 3',5'-T₂-Bestimmungsmethode war es zuerst erforderlich, die für den Radioimmunoassay anzuwendende Endverdünnung des vorgesehenen Antiserums zu ermitteln. Hierzu wurde eine Antiserumkonzentration gewählt, bei der 30-50% des radioaktivmarkierten Antigens gebunden wurden, da bei diesen Bindungswerten die Titrationskurve die größte Steilheit und die Empfindlichkeit der Methode ein Optimum aufweisen.

Abbildung 11 zeigt die im Barbitalspuffersystem ermittelte Titrationskurve.

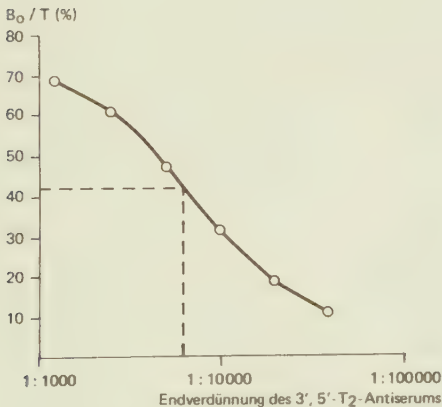


Abb.11: 3',5'-T₂-Antiserumverdünnungskurve

Bei geringer Verdünnung des 3',5'-T₂-Antiserums von 1:1200 wurden 68,4% des ¹²⁵J-3',5'-T₂-Tracers gebunden; bei einer Verdünnung von 1:38400 fiel der antikörpergebundene Anteil auf 10,3% der Gesamtaktivität ab. Aus den oben genannten Gründen wurde als Standardbedingung für den 3',5'-T₂-Radio-

immunoassay eine Antiserumverdünnung von 1:6000 gewählt, was bei Pipettierung von 100 μ l Antiserumlösung pro Ansatzröhrchen (600 μ l Endvolumen) einer Anfangsverdünnung von 1:1000 entsprach. Bei dieser Verdünnung ergab sich aus der Titrationskurve (Abb.11) ein B_0/T -Wert von 42%. Bei den späteren radioimmunologischen Ansätzen zur 3',5'-T₂-Bestimmung in Schilddrüsenhydrolysaten lagen die B_0/T -Werte zwischen 40% und 48%.

4.1.5.3 3',5'-Dijodthyronin-Standardkurve

Abbildung 12 zeigt eine im halblogarithmischen Maßstab dargestellte typische Standardkurve des 3',5'-T₂-Radioimmunoassays für einen Bereich bekannter 3',5'-T₂-Konzentrationen zwischen 40 und 1000 fmol/Inkubationsröhrchen.

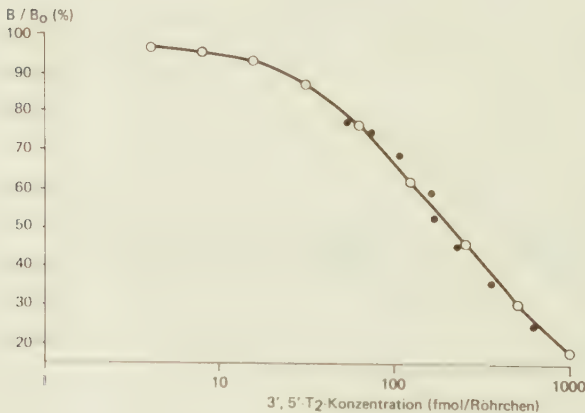


Abb.12: 3',5'-T₂-Standardkurve (-o-) und Werte des Wiederfindungsexperimentes (●)

Zur besseren Vergleichbarkeit verschiedener radioimmunologischer Ansätze wurden die mit steigender Antigenkonzentration abfallenden Werte der antikörpergebundenen Radioaktivitätsanteile in der Weise normiert, daß der Bindungswert bei Abwesenheit von unmarkiertem 3',5'-T₂ (B₀/T) gleich 100% gesetzt und alle weiteren Werte darauf bezogen wurden. Eine Auflistung der antikörpergebundenen Aktivitätsanteile - bezogen auf die Gesamtaktivität (B/T) und in normierter Form (B/B₀) - findet sich für die gewählten Standardkonzentrationen in Tabelle 10. Bei Abwesenheit von unmarkiertem 3',5'-T₂ lag der B/T-Wert bei 47,5%, der B/B₀-Wert bei 100%. Bei der höchsten Jodthyroninkonzentration von 1000 fmol/R fielen die Werte ab auf B/T = 8,6 % bzw. B/B₀ = 18,1 %. Für B/B₀ = 50 (50%-Intercept) ergab sich eine Antigenkonzentration von 200 fmol/R.

Tab.10: Normierung einer Standardkurve für 3',5'-T₂

Standardkonzentration (fmol/R)	B/T (%)	B/B ₀ (%) ⁰
0	47,5	100
3,91	45,0	96,5
7,81	45,2	95,0
15,60	44,4	93,5
31,25	41,0	86,3
62,50	36,2	76,1
125,00	29,4	61,9
250,00	21,7	45,6
500,00	14,3	30,1
1000,00	8,6	18,1

4.1.5.4 Qualitätsmerkmale des 3',5'-Dijodthyronin-Radioimmunoassays

Spezifität

In früheren Arbeiten zur radioimmunologischen 3',5'-T₂-Bestimmung wurden Kreuzreaktionen des 3',5'-T₂-Antiserums mit rT₃ und T₄ beschrieben (9, 35). In Tabelle 11 werden die von uns ermittelten molaren Kreuzreaktivitäten für eine 50%ige Bindungsinhibierung aufgelistet. MIT und KJ zeigen keine nachweisbare Kreuzreaktivität. Die höchste Kreuzreaktivität ermittelten wir für rT₃ mit einem molaren Kreuzreaktivitätsindex von 1,3%. Für T₄ lag der Wert bei 0,0043%, für DIT bei 0,001%. Die Verdrängungskurven der in Tabelle 11 aufgelisteten Jodverbindungen sind in der Abbildung 13 dargestellt.

Tab.11: Kreuzreaktivitäten verschiedener Substanzen mit 3', 5'-T₂-Antiserum

Substanz	Konzentration bei $B/B_0 = 50\%$	molarer Kreuzreakti- vitätsindex (%)
3',5'-T ₂	$2,2 \times 10^{-13}$	100
T ₄	$5,2 \times 10^{-9}$	0,0043
rT ₃	$1,7 \times 10^{-11}$	1,3
DIT	5×10^{-9}	0,001
MIT	$\gg 2,1 \times 10^{-8}$	$\ll 0,001$
KJ	$\gg 2 \times 10^{-8}$	$\ll 0,001$

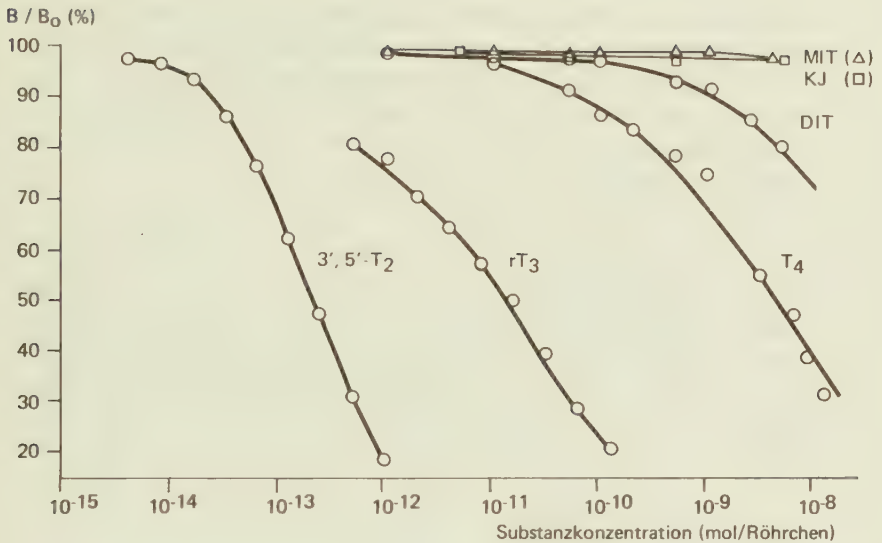


Abb.13: Verdrängung von ^{125}J -3',5'-T₂ vom 3',5'-T₂-Antikörper durch unmarkierte Jodthyronine, Jodtyrosine und Kaliumjodid

Empfindlichkeit

Die untere Nachweisgrenze des 3',5'-T₂-Radioimmunoassays lag bei 4 fmol/R. Das entspricht einer 3',5'-T₂-Konzentration der Hydrolysatproben von 80 fmol/ml. Der 50%-Intercept-Wert variierte in den verschiedenen Ansätzen zwischen 200 und 220 fmol/R, entsprechend 4,0 - 4,4 pmol/ml Hydrolysat.

Wiederfindungsrate

Die radioimmunologisch ermittelten Wiederfindungswerte wurden in Prozent auf die errechneten Werte bezogen, die

Einzelwerte sind in der Tabelle 12 aufgelistet. Der Mittelwert der Wiederfindung im Normalhydrolysat betrug 107% mit einem Bereich zwischen 100% und 114%. Für den Jodmangelansatz ermittelten wir eine mittlere Wiederfindung von 96% mit einem Bereich von 83-108%. Der Mittelwert aller 14 Wiederfindungsansätze betrug 102%.

Tab.12: Wiederfindungsversuch im 3',5',T₂-Radioimmunassay (Hydrolysat)

Hydrolysat Nr.	3',5'-T ₂ -Zu- gabe(fmol/R)	gemessene 3',5'-T ₂ -Konz. (fmol/R)	errechnete 3',5'-T ₂ -Konz. (fmol/R)	Wieder- findung (%)
1	---	108	---	---
	62,5	195	171	114
	125,0	265	233	114
	250,0	395	358	110
	500,0	620	608	102
2	---	105	---	---
	62,5	178	168	106
	125,0	245	230	206
	250,0	375	355	106
	500,0	608	605	100
21	---	39	---	---
	15,6	59	55	108
	31,3	72	70	102
	62,5	100	102	98
	125,0	165	164	100
22	---	30	---	---
	15,6	38	46	83
	31,3	60	61	98
	62,5	78	92	84
	125,0	150	155	97
Mittelwert				102
Standardabweichung				9

Weiterhin trugen wir die Wiederfindungswerte in die dazugehörige Standardkurve ein. Der Verlauf von Standardkurve (-o-) und Wiederfindungskurve(-●-)ist nahezu identisch, wie Abbildung 12 zeigt.

Präzision

Reproduzierbarkeitsversuche der 3',5'-T₂-Bestimmung innerhalb eines Ansatzes ergaben bei 27-facher Bestimmung eines Normalhydrolysates einen Variationskoeffizienten von 5,7%, die Einzelwerte sind in Tabelle 13 aufgelistet. Die mittlere 3',5'-T₂-Konzentration dieses Normalhydrolysates lag bei 112,6 fmol/R, entsprechend 3,81 pmol/mg SD.

Tab. 13: Intraassayreproduzierbarkeit eines Normalhydrolysates im 3',5'-T₂-RIA

Nr.	3',5'-T ₂ -Konzentration (fmol/R)
1	102
2	110
3	122
4	112
5	108
6	111
7	115
8	106
9	118
10	111
11	107
12	113
13	112
14	112
15	118
16	101
17	107
18	120
19	116
20	112
21	120
22	106
23	122
24	101
25	118
26	120
27	120
$\bar{x} = 113$	$s = 6,4$ $VK = 5,7\%$

Da bisher erst drei Ansätze des 3',5'-T₂-Radioimmunoassays durchgeführt wurden, konnte die Interassayreproduzierbarkeit noch nicht beurteilt werden. Beispielhaft werden in Tabelle 14 die gemessenen Werte dreier Kontrollseren dargestellt.

Tab.14: Interassayreproduzierbarkeit im 3',5'-T₂-Radioimmunoassay von drei Hydrolysatproben

Proben Nr.	3',5'-T ₂ -Konzentr. (fmol/R)	Proben Nr.	3',5'-T ₂ -Konzentr. (fmol/R)	Proben Nr.	3',5'-T ₂ -Konzentr. (fmol/R)
2	105 105 102	21	44 39 43	22	27 30 35
$\bar{x}$	104		42		31
s	2		3		4
VK	2%		5%		11%

4.1.5.5 Kreuzreaktivitätskorrektur der gemessenen 3',5'-Dijodthyronin-Konzentrationen im Schilddrüsenhydrolysat

Die wegen der chemischen Ähnlichkeit zu erwartende hohe Kreuzreaktivität mit rT₃ (1,3%) sowie T₄ (0,0043%) und DIT (0,001%) veranlaßten uns, die gemessenen Hydrolysatkonzentrationen hinsichtlich der Kreuzreaktivitätseinflüsse zu korrigieren. Ein Berechnungsbeispiel für die Korrekturen ist in Tabelle 15 gegeben. In Tabelle 16 werden die mittleren 3',5'-T₂-Konzentrationen der einzelnen Kollektive aufgelistet (zur Einteilung der Diätgruppen siehe Kap.2). In der Jodmangelgruppe IIIa lagen die rT₃- und die T₄-Konzentrationen so niedrig, daß der Unterschied zwischen den korrigierten und nicht korrigierten Werten vernachlässigbar war. In den anderen Kollektiven betrug der Korrekturanteil 5-12% der gemessenen 3',5'-T₂-Konzentrationen.

Tab. 15: Korrektur der 3',5'-T₂-Konzentrationen
(alle Konzentrationsangaben in pmol/mg SD)

Gruppe IIa	3',5'-T ₂ - Konz. im Hydrolysat	rT ₃ 1,3%		T ₄ 0,0043%		DIT 0,001%		3',5'-T ₂ - Konzentrat.
1	3,287	10,54	0,137	596	0,027	1944	0,019	3,095
2	2,691	10,66	0,139	688	0,030	1903	0,019	2,503
3	2,490	7,00	0,091	548	0,024	1533	0,021	2,391
4	2,595	12,09	0,157	600	0,026	2052	0,021	2,391
5	2,800	12,17	0,158	630	0,027	1732	0,017	2,598

Tab.16: 3',5'-T₂-Konzentrationen im Schilddrüsenhydrolysat

Gruppe	gemessene 3',5'-T ₂ -Konz. (pmol/mg SD)	korrigierte 3',5'-T ₂ -Konz. (pmol/mg SD)
Ia Normalgruppe	3,36 ± 0,69	3,05 ± 0,66
IIa LID+7,5 µ J ⁻ /d	2,58 ± 0,44	2,40 ± 0,43
IIIa LID	0,61 ± 0,27	0,57 ± 0,26
IVa LID+Perchlorat 4 µl/d	<0,06	---
Va LID+0,8 µg J ⁻ /d	1,47 ± 0,54	1,40 ± 0,50
VIa LID+15 µg J ⁻ /d	2,28 ± 0,37	2,11 ± 0,36
Ib Normalgruppe	3,04 ± 0,32	2,75 ± 0,30
IIb 126 µg J ⁻ /d	3,56 ± 0,54	3,13 ± 0,45
IIIb 660 µg J ⁻ /d	3,53 ± 0,51	3,11 ± 0,45
IVb 2000 µg J ⁻ /d	3,61 ± 0,33	3,17 ± 0,32

4.2 Auswirkungen der abgestuften Jodalimentation auf das Gesamtkörpergewicht und Schilddrüsengewicht

Vergleichen wir das Anfangs- mit dem Endgewicht der Ratten, so fand über den Zeitraum von zehn Wochen keine signifikante ($p < 0,35$) Gewichtsveränderung statt. Da das mittlere Lebendgewicht der Tiere pro Gruppe etwas variierte, entschlossen wir uns, das Schilddrüsengewicht auf 100 g Lebendgewicht zu beziehen.

Betrachtet man die Mittelwerte der einzelnen Gruppen, so lassen sich deutliche Auswirkungen der Joddiät erkennen (Tabelle 17).

Tab.17: Gewichtsverhalten von Gesamtkörper und Schilddrüse bei variierender Jodzufuhr ($\bar{x} \pm s$)

Gruppe	Anfangskörpergewicht (g)	Endkörpergewicht (g)	Gesamt-Schilddrüsengewicht (mg)	normiertes SD-gewicht (mg/100 g KG)
Ia Normalgruppe	270 $\pm$ 25	274 $\pm$ 25	20,2 $\pm$ 3,5	7,4 $\pm$ 1,2
IIa LID+7,5 μ g J ⁻ /d	238 $\pm$ 14	243 $\pm$ 12	18,9 $\pm$ 2,3	7,8 $\pm$ 0,8
IIIa LID	270 $\pm$ 30	285 $\pm$ 33	40,7 $\pm$ 8,4	14,3 $\pm$ 2,5
IVa LID+Perchlorat 4 μ g/d	233 $\pm$ 20	241 $\pm$ 21	49,0 $\pm$ 6,7	20,5 $\pm$ 3,2
Va LID+0,8 μ g J ⁻ /d	250 $\pm$ 44	256 $\pm$ 43	26,5 $\pm$ 5,6	10,5 $\pm$ 2,2
VIa LID+15 μ g J ⁻ /d	268 $\pm$ 28	269 $\pm$ 30	24,5 $\pm$ 3,7	9,3 $\pm$ 1,3
Ib Normalgruppe	206 $\pm$ 11	209 $\pm$ 13	15,9 $\pm$ 2,1	7,6 $\pm$ 0,7
IIb 126 μ g J ⁻ /l	200 $\pm$ 11	204 $\pm$ 11	14,6 $\pm$ 2,9	7,3 $\pm$ 1,5
IIIb 660 μ g J ⁻ /l	200 $\pm$ 10	203 $\pm$ 10	15,1 $\pm$ 2,1	7,6 $\pm$ 1,0
IVb 2000 μ g J ⁻ /l	205 $\pm$ 14	210 $\pm$ 10	14,4 $\pm$ 3,3	6,9 $\pm$ 1,6

Das mittlere Schilddrüsengewicht pro 100 g Körpergewicht des Normalkollektivs Ia und der nach TAUROG und Mitarbeitern (91) mit LID + 7,5 µg Jodid pro Tag substituierten Gruppe IIa war nahezu identisch. In der Jodmangelgruppe IIIa hatte sich nach zehnwöchiger Diät das Schilddrüsengewicht verdoppelt. In der zusätzlich mit Natriumperchlorat behandelten Gruppe IVa nahm das Gewicht der Schilddrüse um den Faktor 2,7 zu. Vergleicht man das Schilddrüsengewicht der Gruppen Va und VIa mit dem der Jodmangelgruppe IIIa, so ist festzustellen, daß durch die in den letzten Tagen durchgeführte Jodsubstitution (0,8 bzw. 15 µg J⁻/d) eine partielle Strumarückbildung erfolgte. Im Gegensatz zur Jodmangelernährung führte Jodüberschuß zu keiner Veränderung des Schilddrüsengewichtes.

4.3 Intra- und extrathyreoidale Jodaminosäurekonzentrationen bei unterschiedlichen Jodmangelzuständen

4.3.1 Jodaminosäurenkonzentrationen im Schilddrüsenhydrolysat

Die mit Hilfe der einzelnen Radioimmunoassays bestimmten Jodaminosäurekonzentrationen in den Rattenschilddrüsen werden in Tabelle 18 dargestellt. Die Mittelwerte der Jodmangelgruppen IIa bis IVa wurden mit den Konzentrationen des Normalkollektivs Ia verglichen, ebenso die Reexpositionskollektive Va und VIa. Legt man die Werte der Jodmangelgruppe IIIa zugrunde, so waren die Hormonspeicher zum Startpunkt des Reexpositionsversuches mit Kaliumjodid relativ entleert. Aber schon nach der 14-tägigen graduerten Jodzufuhr machte sich in beiden Kollektiven mit abnehmendem Schilddrüsengewicht (s.Tab. 17) ein deutlicher antistrumiger Effekt bemerkbar. Entsprechend verhielten sich die Jodaminosäurekonzentrationen in der Schilddrüse und im Serum, wie im folgenden dargestellt wird.

Tab.18: Jodaminosäurekonzentrationen im Schilddrüsengewebe bei graduierter Jodzufuhr ($\bar{x} \pm s$), sämtliche Ergebnisse in pmol/mg Schilddrüsengewebe

Gruppe	n	DIT	T_4	T_3	rT_3	$3',3'-T_2$	$3',5'-T_2$
Ia Normalgruppe	13	2266 $\pm$ 389	722 $\pm$ 163	73,4 $\pm$ 11,0	21,2 $\pm$ 11,0	2,22 $\pm$ 0,32	3,05 $\pm$ 0,6
IIa LID+7,5 μ lJ $^-$ /d	15	1775 $\pm$ 311	569 $\pm$ 89	53,0 $\pm$ 11,0	10,2 $\pm$ 2,2	0,93 $\pm$ 0,23	2,40 $\pm$ 0,4
IIIa LID	15	52 $\pm$ 31	18,7 $\pm$ 11	9,2 $\pm$ 5,1	1,45 $\pm$ 1,11	0,53 $\pm$ 0,37	0,59 $\pm$ 0,2
IVa LID+Perchlorat 4 μ g/d	15	5 $\pm$ 3	1,9	0,33 $\pm$ 0,11	0,15	0,3	0,1
Va LID+0,8 μ gJ $^-$ /d	14	292 $\pm$ 176	103 $\pm$ 63	24 $\pm$ 12	6,31 $\pm$ 3,80	0,69 $\pm$ 0,35	1,40 $\pm$ 0,5
VIa LID+15 μ gJ $^-$ /d	15	1508 $\pm$ 369	393 $\pm$ 132	50 $\pm$ 13	13,0 $\pm$ 3,08	1,07 $\pm$ 0,25	2,11 $\pm$ 0,5

* Die Jodapplikation erfolgte während der letzten 14 Tage intraperitoneal

Thyroxin

Die Thyroxinkonzentrationen des Normalkollektivs Ia variierten zwischen 520 und 991 pmol/mg SD bei einem Mittelwert von 722 $\pm$ 163 pmol/mg SD. In dem jodsubstituierten Kollektiv IIa - dem künstlichen Normalkollektiv - lag der Mittelwert von 569 $\pm$ 89 pmol/mg SD deutlich unter dem der Normalgruppe Ia. Die Extremwerte erstreckten sich in der Gruppe IIa von 424-759 pmol/mg SD. Die Auswirkungen der Jodmangelalimentation waren sehr eindrucksvoll. In der LID-Gruppe IIIa erreichte die mittlere T_4 -Konzentration von 18,7 $\pm$ 11,1 pmol/mg SD nur 3% des mittleren Normalwertes. Die T_4 -Konzentration der mit Perchlorat

rat behandelten Gruppe IVa lagen zu 80% unter der Nachweisgrenze des Assays von $1,9 \text{ pmol/mg SD}$. Der höchste meßbare T_4 -Wert lag bei $4,8 \text{ pmol/mg SD}$. Die mittlere Thyroxinkonzentration der Jodreexpositionsgruppe Va ($0,8 \mu\text{g J}^-/\text{d}$) betrug $103 \pm 63 \text{ pmol/mg SD}$. Im Verhältnis zur Jodmangelgruppe IIIa kam es zu einer Thyroxinkonzentrationssteigerung um den Faktor 5-6, es fanden sich aber nur 14% des mittleren Normalwertes (Ia). In der zweiten Jodreexpositionsgruppe VIa ($15 \mu\text{g/pmol J}^-/\text{d}$) erreichte die mittlere T_4 -Konzentration von $393 \pm 132 \text{ pmol/mg SD}$ schon 54% des mittleren Normalwertes; im Verhältnis zur Jodmangelgruppe IIIa fand eine Konzentrationssteigerung um den Faktor 20 statt.

Trijodthyronin

Die T_3 -Konzentrationen des Normalkollektivs variierten von $57-98 \text{ pmol/mg SD}$ bei einem Mittelwert von $73 \pm 11 \text{ pmol/mg SD}$. In dem substituierten Normalkollektiv IIa lag der Mittelwert bei $53 \pm 11 \text{ pmol/mg SD}$. Durchschnittlich lagen die Einzelergebnisse um 28% niedriger als im Normalkollektiv Ia. In der Jodmangelgruppe IIIa fanden wir nur noch 12% der T_3 -Werte des Normalkollektivs. Der Mittelwert dieser Gruppe lag bei $9,2 \pm 5,1 \text{ pmol/mg SD}$. Die Extremwerte erstreckten sich in dieser Gruppe von $22,1 - 3,4 \text{ pmol/mg SD}$. Die Perchloratgruppe IVa wies einen mittleren T_3 -Gehalt von $0,33 \pm 0,11 \text{ pmol/mg SD}$ auf, das entsprach nur noch 0,5% der Werte des Vergleichskollektivs. Der höchste Wert dieser Gruppe lag bei $0,67 \text{ pmol/mg SD}$, der niedrigste bei $0,25 \text{ pmol/mg SD}$. In der Reexpositionsgruppe Va ($0,8 \mu\text{g J}^-/\text{d}$) ermittelten wir einen Durchschnittswert von 24 pmol/mg SD , das entsprach im Mittel 33% der Werte des Normalkollektivs. Im Vergleich zur Jodmangelgruppe IIIa hatte sich die mittlere T_3 -Konzentration bereits um den Faktor 2,5 erhöht. Die mittlere T_3 -Konzentration der Gruppe VIa ($15 \mu\text{g J}^-/\text{d}$) betrug 50 pmol/mg SD , im Mittel 68% der T_3 -Konzentration des Normalkollektivs. Im Verhältnis zur Jodmangelgruppe IIIa hatte sich die T_3 -Konzentration um den Faktor 5,5 erhöht.

Reverse Trijodthyronin

In den Hydrolysaten des Normalkollektivs Ia konnten wir einen mittleren rT_3 -Gehalt von $21,5 \pm 5,5$ pmol/mg SD nachweisen, die Werte variierten von 28,9 bis 14,7 pmol/mg SD. In der jodsubstituierten Gruppe IIa, die aufgrund der für T_4 und T_3 beschriebenen Konzentrationsminderung als schwach insuffizient eingestuft werden mußte, fanden wir einen signifikanten Unterschied der rT_3 -Konzentration im Verhältnis zum Vergleichskollektiv Ia ($p < 0,0005$). Als Mittelwert errechneten wir $10,2 \pm 2,2$ pmol/mg SD, das entsprach im Mittel 47% der Werte des Vergleichskollektivs Ia. In der Jodmangelgruppe IIIa war der Mittelwert auf $1,45 \pm 1,11$ pmol/mg SD herabgesunken, das entsprach nur noch 7% des Mittelwertes der Gruppe Ia. Die Werte der Perchloratgruppe IVa lagen zu 100% unter der Nachweisgrenze des Assays von 0,15 pmol/mg SD. Als mittlere rT_3 -Konzentration der Gruppe Va ($0,8 \mu\text{g J}^-/\text{l}$) errechneten wir $5,31 \pm 3,80$ pmol/mg SD, das entsprach im Mittel 25% der rT_3 -Werte des Normalkollektivs Ia. Im Verhältnis zur Jodmangelgruppe IIIa hatte sich die rT_3 -Konzentration um den Faktor 3,5 erhöht. In der Gruppe VIa ($15 \mu\text{g J}^-/\text{d}$) fand sich ein Mittelwert von $13,04 \pm 3,08$ pmol/mg SD. Im Verhältnis zur Jodmangelgruppe IIIa war hier der Mittelwert um den Faktor 9 angestiegen, es fanden sich aber nur 62% der mittleren rT_3 -Normalkonzentration.

3,3'-Dijodthyronin

Da die molare Kreuzreaktivität für T_3 im 3,3'- T_2 -Radioimmunoassay 0,31% (54) betrug, wurden die gemessenen Werte um diesen Faktor korrigiert. Der mittlere 3,3'- T_2 -Gehalt des Normalkollektivs Ia betrug $2,36 \pm 0,48$ pmol/mg SD. Die Werte lagen in einem Bereich von 2,93 bis 1,73 pmol/mg SD. In der schwach insuffizienten Gruppe IIa fanden wir durchschnittlich nur 42% der Werte des Normalkollektivs Ia, im Mittel

$0,93 \pm 0,23$ pmol/mg SD. In der Jodmangelgruppe IIIa lag der Mittelwert bei $0,53 \pm 0,37$ pmol/mg SD. In der Perchloratgruppe IVa lagen sämtliche Proben unter der Nachweisgrenze des Assays von $0,27$ pmol/mg SD. In dem Reexpositionskollektiv Va ($0,8 \mu\text{g J}^-/\text{d}$) fand sich eine geringe Zunahme der $3,3'$ - T_2 -Konzentration im Verhältnis zur Jodmangelgruppe IIIa um den Faktor 1,4. Der Mittelwert von $0,69 \pm 0,35$ pmol/mg SD erreichte aber nur 32% des mittleren Normalwertes. Die mittlere $3,3'$ - T_2 -Konzentration der Gruppe VIa ($15 \mu\text{g J}^-/\text{d}$) - $1,07 \pm 0,25$ pmol/mg SD - hatte sich im Verhältnis zur Jodmangelgruppe verdoppelt, lag aber noch um 50% unter der des Normalkollektivs.

3',5'-Dijodthyronin

Die mittlere $3',5'$ - T_2 -Konzentration in den Hydrolysaten normal ernährter Ratten betrug $3,05 \pm 0,55$ pmol/mg SD. Als höchste und niedrigste Konzentration wurden Werte von 4,63 bzw. $2,01$ pmol/mg SD errechnet. Die mittlere $3',5'$ - T_2 -Konzentration des Kollektivs IIa, das über zehn Wochen eine subnormale Joddiät erhalten hatte, lag geringfügig unter der des Normalkollektivs, im Mittel $2,40 \pm 0,43$ pmol/mg SD; dies entspricht 79% des mittleren Normalgewichts. Auch bei diesem Hormonmetaboliten konnten deutliche Auswirkungen der Jodmangelalimentation festgestellt werden. Die gemessenen Werte der Gruppe IIIa lagen in einem Bereich von 0,29 bis $1,27$ pmol/mg SD, der Mittelwert betrug $0,59 \pm 0,26$ pmol/mg SD, also nur noch 19% des mittleren Normalwertes. In dem Perchloratkollektiv IVa lagen 100% der Ansätze unter der Nachweisgrenze der Methode von 80 fmol/ml Hydrolysat. Auch für diesen Hormonmetaboliten ermittelten wir eine Konzentrationszunahme in Relation zur Jodmangelgruppe IIIa in den Reexpositionsguppen. In der Gruppe Va ($0,8 \mu\text{g J}^-/\text{d}$) fand sich ein um den Faktor 2,4 erhöhter Mittelwert von $1,40 \pm 0,50$ pmol/mg SD. In der Gruppe VIa ($15 \mu\text{g J}^-/\text{d}$) erhöhte

sich der Mittelwert um den Faktor 3,6 auf $2,11 \pm 0,36$ pmol/mg SD, erreichte aber nur 70% des mittleren Normalwertes.

Dijodtyrosin

Wie zu erwarten, fanden sich sehr hohe DIT-Konzentrationen in den Hydrolysaten des Normalkollektivs Ia. Die Werte schwankten zwischen 1642 und 2863 pmol/mg SD. Der Mittelwert $\pm$ Standardabweichung lagen bei 2267 ± 389 pmol/mg SD. In der schwach jodinsuffizienten Gruppe IIa fanden wir 78%, im Mittel 1775 ± 311 pmol/mg SD. In der Jodmangelgruppe IIIa ermittelten wir 2%, im Mittel 52 ± 31 pmol/mg SD und in der Perchloratgruppe IVa nur 0,2% ($4,6 \pm 2,8$ pmol/mg SD) der Werte des Normalkollektivs. In der Gruppe Va erhöhte sich der Mittelwert auf 292 ± 176 pmol/mg SD, entsprechend 13% des mittleren Normalwertes. Mit einer mittleren Konzentration von 1508 ± 369 pmol/mg SD fanden sich im Kollektiv VIa ($15 \mu\text{g J}^-/\text{d}$) bereits 67% des mittleren Normalwertes.

4.3.2 Jodthyroninkonzentrationen im Serum jodinsuffizienter Ratten

Das hauptsächliche Sekretionsprodukt der Schilddrüse ist das Thyroxin, während Trijodthyronin und reserves Trijodthyronin nur in geringem Maße von der Schilddrüse ausgeschüttet werden. Das im Blut zirkulierende T_3 und rT_3 wird im wesentlichen durch periphere Dejodierung von T_4 gebildet. Die mit Hilfe des Radioimmunoassays bestimmten Serumkonzentrationen dieser Jodthyronine werden in Tabelle 19 dargestellt.

Tab.19: Jodaminosäurekonzentrationen im Serum bei graduierter Jodzufuhr ($\bar{x} \pm s$), sämtliche Ergebnisse in pmol/ml Serum

Gruppe	n	T_4	T_3	rT_3
Ia Normalgruppe	14	54 ± 13	$1,31 \pm 0,19$	$0,23 \pm 0,12$
IIa $LID+5 \mu g J^-/d$	15	56 ± 15	$1,50 \pm 0,18$	$0,18 \pm 0,10$
IIIa LID	17	11 ± 5	$1,60 \pm 0,35$	$<0,10$
IVa $LID+Perchlorat 4 \mu g/d$	15	$<2,4$	$0,54 \pm 0,09$	$<0,10$
Va $LID+0,8 \mu g J^-/d$	14	53 ± 14	$1,63 \pm 0,14$	$0,19 \pm 0,11$
VIa $LID+15 \mu g J^-/d$	12	58 ± 15	$1,57 \pm 0,25$	$0,21 \pm 0,09$

Die mittlere T_4 -Konzentration des Normalkollektivs Ia betrug 54 ± 13 pmol/ml. Die Einzelwerte variierten von 37 bis 81 pmol/ml. Die Werte der jodsubstituierten Gruppe IIa waren mit denen des Normalkollektivs identisch. Erst bei stärkerem Jodmangel (IIIa) kam es zu einer signifikanten Abnahme der mittleren T_4 -Konzentration auf 11 ± 5 pmol/ml, die Extremwerte in der Gruppe IIIa lagen in einem Bereich von 5-20 pmol/ml. In der mit Perchlorat behandelten, also stark insuffizienten Gruppe IVa, waren keine T_4 -Konzentrationen nachweisbar. Vergleichen wir die mittlere T_4 -Konzentration von 53 ± 14 pmol/ml der Gruppe Va ($0,8 \mu g J^-/d$) und die von 58 ± 15 pmol/ml der Gruppe VIa ($15 \mu g J^-/d$) mit der der Jodmangelgruppe IIIa, können wir feststellen, daß sich in beiden Gruppen die T_4 -Konzentration durch 14-tägige Jodreexposition wieder normalisierte.

Wie die T_3 -Werte der Gruppe IIIa zeigen, vermag die Schilddrüse auch bei ausgesprochener Jodeinschränkung den peripheren T_3 -Haushalt lange zu sichern. Die mittleren T_3 -Serumspiegel der Gruppen Ia, IIa und IIIa mit Werten zwischen 1,31 und 1,60 pmol/ml zeigten keine signifikanten Unterschiede. Erst unter zusätzlicher Perchloratblockade (IVa) kam es zu einem Absinken der mittleren T_3 -Serumkonzentration auf 0,54 pmol/ml mit Einzelwerten, die im Bereich zwischen 0,43 und 0,72 pmol/ml streuten. In den Reexpositiongruppen Va ($1,63 \pm 0,14$ pmol/ml) und VIa ($1,57 \pm 0,25$ pmol/ml) ließen sich ebenfalls keine Abweichungen von der mittleren T_3 -Konzentration des Normalkollektivs Ia feststellen.

Die meßbaren rT_3 -Konzentrationen des Normalkollektivs Ia lagen im Mittel bei 0,23 pmol/ml mit Werten zwischen 0,20 und 0,42 pmol/ml. 33% der Werte lagen unter der Nachweisgrenze des Ansatzes von 0,18 pmol/ml. Diese nicht meßbaren Werte bezogen wir mit 50% der unteren Nachweisgrenze, das heißt 0,09 pmol/ml in die Mittelwertberechnung ein. In der jodsubstituierten Gruppe IIa lagen 53% der Proben unter der Nachweisgrenze. In der Jodmangelgruppe IIIa und in der Perchloratgruppe IVa konnten keine rT_3 -Konzentrationen nachgewiesen werden. Die rT_3 -Serumkonzentrationen der Gruppe Va, die während der letzten 14 Tage $0,8 \mu\text{g J}^-/\text{d}$ intraperitoneal injiziert bekam, hatten sich wieder normalisiert. Sie lagen im Mittel bei $0,19 \pm 0,11$ pmol/ml. Ebenso normalisierte sich rT_3 in der Gruppe VIa, die $15 \mu\text{g J}^-/\text{d}$ i.p. injiziert bekam. Der Mittelwert dieser Gruppe lag bei 0,21 pmol/ml.

Stellvertretend für die gesamten Proben bestimmten wir die $3,3'$ - T_2 -Serumkonzentration für das Normalkollektiv Ia sowie für die Jodmangelgruppe IIIa (s.Kap.3.3). In beiden Kollektiven lagen sämtliche Werte unter der Nachweisgrenze des Assays von 9,4 pg/ml.

4.4 Intra- und extrathyreoidale Jodaminosäurekonzentrationen bei Jodüberschuß

4.4.1 Jodaminosäurekonzentrationen im Schilddrüsenhydrolysat

In einer zweiten Versuchsreihe untersuchten wir die Auswirkungen eines Jodüberschusses auf die intrathyreoidalen Jodaminosäurekonzentrationen jodinsuffizienter Ratten. In Tabelle 20 sind die DIT- und Jodthyroninkonzentrationen im Schilddrüsengewebe aufgelistet.

Tab.20: Jodaminosäurekonzentrationen im Schilddrüsengewebe bei Jodüberschuß ($\bar{x} \pm s$), sämtliche Ergebnisse in pmol/mg Schilddrüsengewebe

Gruppe	n	DIT	T ₄	T ₃	rT ₃	3,3'-T ₂	3',5'-T ₂
Normalgruppe	10	1866 [±] 148	671 [±] 48	61 [±] 6	18,6 [±] 2,9	1,75 [±] 0,22	2,67 [±] 0,43
NID [*] +126 µg J ⁻ /d	11	2650 [±] 465	799 [±] 114	70 [±] 11	28,1 [±] 4,2	2,00 [±] 0,35	3,13 [±] 0,45
NID +660 µg J ⁻ /d	11	2834 [±] 137	671 [±] 137	51 [±] 14	28,0 [±] 5,9	1,92 [±] 0,40	3,11 [±] 0,45
NID+2000 µg J ⁻ /d	12	2757 [±] 480	651 [±] 147	53 [±] 13	29,2 [±] 6,4	1,89 [±] 0,37	3,18 [±] 0,25

* NID = normale Joddiät

Die mittlere T₄-Konzentration der Normalgruppe Ib betrug 671 [±] 48 pmol/mg SD, die Extremwerte erstreckten sich von 523 bis 764 pmol/mg SD. Die gemittelte T₃-Konzentration dieses Kollektivs lag bei 61 [±] 6 pmol/mg SD, die Einzelwerte variierten in einem Bereich von 48 bis 60 pmol/mg SD. Wie der Tabelle 20 zu entnehmen ist, waren für die Gruppen IIb - IVb keine signifikanten Abweichungen der Schilddrüsenhormonkonzentrationen von den mittleren Normalwerten der Gruppe Ib nachzuweisen.

Die mittlere rT_3 -Konzentration in der Normalgruppe Ib betrug $18,6 \pm 2,9$ pmol/mg SD, die Einzelwerte erstreckten sich über einen Bereich von 13,5 bis 22,2 pmol/mg SD. In der mit einem milden Jodüberschuß versehenen Gruppe IIb ($126 \mu\text{g J}^-/\text{d}$) fand sich eine Konzentrationszunahme um 51%, der Mittelwert lag bei $28,1 \pm 4,2$ pmol/mg SD. Trotz noch höherem Jodüberschuß konnte weder in der Gruppe IIb ($660 \mu\text{g J}^-/\text{d}$) noch IVb ($2000 \mu\text{g J}^-/\text{d}$) eine weitere rT_3 -Zunahme festgestellt werden, es kam gleichsam zu einer Plateauierung.

Die $3,3'$ - T_2 -Konzentration des Normalkollektivs Ib lag im Mittel bei $1,75 \pm 0,22$ pmol/mg SD, die mittlere $3',5'$ - T_2 -Konzentration bei $2,67 \pm 0,43$ pmol/mg SD. Für diese beiden Hormonmetaboliten konnte ebenfalls durch erhöhte Jodzufuhr keine Konzentrationszunahme in den Gruppe IIb bis IVb erzielt werden.

Wie in dem Jodmanglexperiment fanden sich auch hier im Normalkollektiv Ib hohe DIT-Konzentrationen, im Mittel 1866 ± 148 pmol/mg SD. In der Gruppe IIb ließ sich durch milden Jodüberschuß ($126 \mu\text{g J}^-/\text{d}$) eine Konzentrationszunahme um 42% erzielen, der Mittelwert lag bei 2650 ± 465 pmol/mg SD, doch selbst durch massiven Jodüberschuß konnte keine weitere Konzentrationszunahme erzielt werden, wie die Gruppen IIb und IVb veranschaulichen.

4.4.2 Jodthyroninkonzentrationen im Serum (Jodüberschuß)

Die Hormonkonzentrationen im Serum werden in Tabelle 21 aufgelistet. Die T_4 -Konzentration der Normalgruppe Ib variierte von 43 bis 86 pmol/ml bei einem Mittelwert von 55 ± 12 pmol/ml. Als mittlere T_3 -Konzentration errechneten wir $1,13 \pm 0,18$ pmol/ml mit einem Variationsbereich von

0,90 bis 1,30 pmol/ml. Die mittlere rT_3 -Konzentration der Normalgruppe Ib lag bei $0,17 \pm 0,03$ pmol/ml mit einem Streubereich von 0,12 bis 0,23 pmol/ml. In den Jodüberschußgruppen IIb (126 $\mu\text{g J}^-/\text{d}$), IIIb (660 $\mu\text{g J}^-/\text{d}$) und IVb (2000 $\mu\text{g J}^-/\text{d}$) konnten keine signifikanten Abweichungen von den oben angeführten Mittelwerten festgestellt werden.

Tab.21: T_4 -, T_3 - und rT_3 -Konzentrationen im Serum bei erhöhter Jodzufuhr, sämtliche Ergebnisse in pmol/ml

Gruppe	T_4	T_3	rT_3
Ib Normalgruppe	55 ± 12	$1,13 \pm 0,18$	$0,17 \pm 0,03$
IIb 126 $\mu\text{g J}^-/\text{d} + \text{NID}^*$	49 ± 12	$1,07 \pm 0,18$	$0,17 \pm 0,03$
IIIb 660 $\mu\text{g J}^-/\text{d} + \text{NID}$	58 ± 11	$1,19 \pm 0,20$	$0,17 \pm 0,02$
IVb 2000 $\mu\text{g J}^-/\text{d} + \text{NID}$	50 ± 9	$1,10 \pm 0,16$	$0,15 \pm 0,03$

* NID = normaler Jodgehalt des Rattenfutters und Trinkwassers (normal iodine diet)

4.5 Intrathyreoidaler Jodaminosäurestatus bei Jodmangel und Jodüberschuß

Um den Einfluß des Jodids auf die Schilddrüsenhormonsynthese zu veranschaulichen, werden in Tabelle 22 die mittleren Konzentrationsquotienten verschiedener Jodaminosäurekonzentrationen zusammengefaßt, die aus den individuellen Schilddrüsenhormonkonzentrationen berechnet wurden.

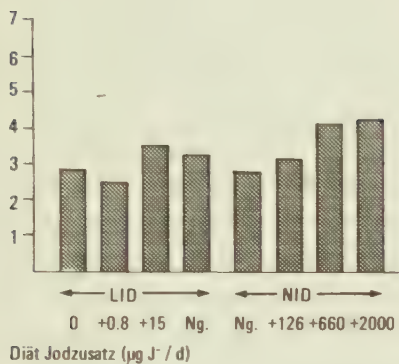
Graphische Darstellungen der Konzentrationsverhältnisse bei unterschiedlicher Jodzufuhr finden sich in der Abbildung 14.

Tab.22: Konzentrationsquotienten verschiedener Jodaminosäuren in der Schilddrüse bei Jodmangel (a) und Jodüberschuß (b)

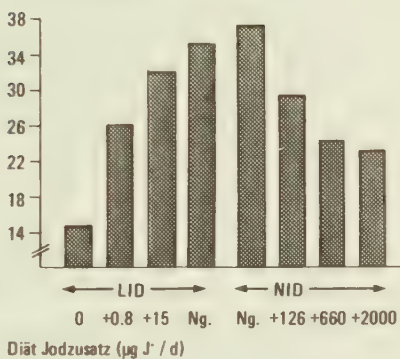
Gruppe	DIT/T ₄	T ₄ /T ₃	T ₄ /rT ₃	T ₃ /T ₄
IIIa LID	2,8 ± 0,6	2,10 ± 0,88	15 ± 6	7,18 ± 1,76
Va LID+0,8 µg J ⁻ /d	2,5 ± 0,7	5,17 ± 1,10	26 ± 11	5,28 ± 2,16
VIa LID+ 15 µg J ⁻ /d	3,5 ± 0,3	8,06 ± 1,46	32 ± 4	4,13 ± 0,90
Ia Normalgruppe	3,3 ± 0,6	9,78 ± 1,15	35 ± 5	3,59 ± 0,64
Ib Normalgruppe	2,8 ± 0,3	11,10 ± 1,36	37 ± 6	3,30 ± 0,29
IIb NID+126 µg J ⁻ /d	3,3 ± 0,2	11,50 ± 1,17	29 ± 2	2,49 ± 0,23
IIIB NID+660 µg J ⁻ /d	4,3 ± 0,4	13,51 ± 1,57	24 ± 2	1,81 ± 0,27
IVb NID+2000 µg J ⁻ /d	4,3 ± 0,8	12,51 ± 1,39	23 ± 3	1,81 ± 0,23

Abbildung 14a (DIT/T₄) veranschaulicht, daß das Konzentrationsverhältnis zwischen DIT und T₄ im Verhältnis zu den anderen Quotienten nur geringen Änderungen trotz großer Unterschiede im Jodangebot unterlag. Am Anstieg des DIT/T₄ Quotienten von 2,5 bis 2,8 bei Jodmangel auf Werte von 4,3 bei Jodüberangebot verdeutlichte, daß DIT im Jodmangel verstärkt zur T₄-Synthese benötigt wurde. Bei erhöhter Jodzufuhr wurde DIT im Überschuß synthetisiert.

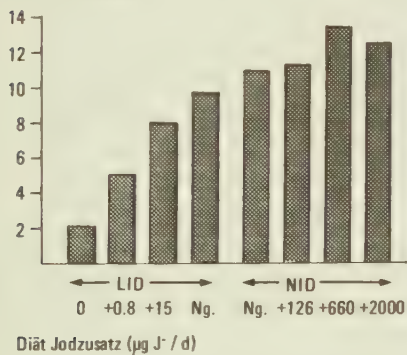
a) molares Verhältnis DIT / T₄



c) molares Verhältnis T₄ / rT₃



b) molares Verhältnis T₄ / T₃



d) molares Verhältnis T₃ / rT₃

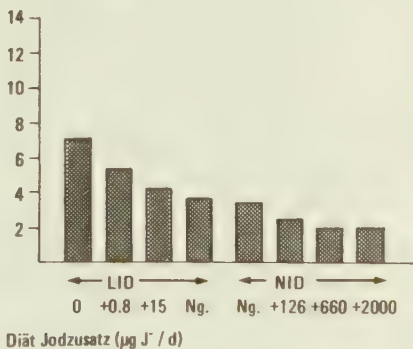


Abb.14 a - d: Graphische Darstellung der intrathyreoidalen Jodthyronin/tyrosin-Quotienten bei differenzierter Jodalimentation

LID = Jodmangelfutter (low iodine diet)

NID = normales Futter (normal iodine diet)

Der gravierendste Einfluß durch die Jodmangelalimentation zeigte sich am Verhältnis der thyreoidalen Konzentrationen von T_4 und T_3 (Abb. 14 b). Während bei schwerem Jodmangel pro Molekül T_3 nur 2 Moleküle T_4 gebildet wurden, erhöhte sich der T_4/T_3 -Quotient auf 10 bei normalem Jodangebot, stieg also um das Fünffache an. Selbst durch massivsten Jodüberschuß ließ sich nur eine Steigerung auf das Sechsfache in Relation zum Jodmangel erzielen, wie aus Tabelle 22 zu entnehmen ist.

Abbildung 14 c (T_4/rT_3) unterscheidet sich von den vorhergehenden durch keine lineare Entwicklung des Quotienten. Sowohl im Jodmangel als auch im Jodüberschuß kam es zu einer Abnahme des T_4/rT_3 -Quotienten. Betrachtet man die Schilddrüsenhydrolysatkonzentrationen der beiden Thyronine (s. Tabelle 18), so fällt auf, daß die T_4 -Konzentration der Jodmangelgruppe IIIa auf etwa 1/40 des Wertes des Normalkollektivs Ia absank, während die thyreoidale rT_3 -Konzentration bei Jodmangel nur auf 1/15 des Normalwertes reduziert wurde. Es kam also zu einem relativen Überwiegen der rT_3 -Konzentration im Jodmangel, was sich in einem kleineren T_4/rT_3 -Quotienten ausdrückte. Im Jodüberschußexperiment blieben die T_4 -Konzentrationen im Verhältnis zum Normalkollektiv Ib konstant, die rT_3 -Konzentrationen hingegen stiegen an (s. Tab. 20), so daß es auch hier zur Bildung eines kleineren Quotienten im Verhältnis zum Normalkollektiv kam.

In Abbildung 14 d ist der T_3/rT_3 -Quotient dargestellt. Am kontinuierlichen Abfall dieses Quotienten von 7,2 im Jodmangel auf Werte von 1,8 im Jodüberangebot wurde deutlich, daß im Jodmangel die T_3 -Synthese, im Jodüberschuß die rT_3 -Bildung bevorzugt wurde.

5 DISKUSSION

5.1 Schilddrüsenaufarbeitung

Eine häufig angewendete Methodik zur Konzentrationsbestimmung der intrathyreoidalen Hormonverhältnisse ist die proteolytische Verdauung von Schilddrüsenhomogenaten mit anschließender selektiver Konzentrationsbestimmung mittels des Radioimmunoassays. Zur proteolytischen Verdauung setzten wir das Enzym Pronase ein, das als Protease die Spaltung von Peptidbindungen katalysiert, also der C-N-Bindungen zwischen dem Thyreoglobulin und dessen Thyronin- und Tyrosinanteilen.

Wie unter 4.1.1 dargestellt, waren erst nach Pronasedigestion freie Hormone papierchromatographisch nachweisbar. Da Pronase eine Protease ist, spaltet sie auch die intrathyreoidal vorliegenden Dejodasen, so daß nach Freisetzung der Hormone aus dem Thyreoglobulinspeicher die Dejodierung der Hormone und ihrer Metaboliten durch intrathyreoidale Dejodasen unwahrscheinlich ist.

INOUE u. TAUROG (44) beobachteten, daß markiertes T_4 , das Schilddrüsenhomogenaten hinzugefügt wurde, ohne Zusatz von proteolytischen Enzymen, extensiv degradiert wurde. Dieser Degradationsvorgang konnte vollständig inhibiert werden, indem die Schilddrüse vor der enzymatischen Verdauung mit TRIS-Puffer perfundiert wurde. Diese Beobachtung führte zu der Annahme, daß ein Bestandteil des Blutes ausschlaggebend an der oben genannten Degradation beteiligt sei und keine intrathyreoidalen Komponenten wie Dejodasen. Die Wirkungsweise des 1-Methyl-1-mercapto-imidazol (MMI), die Degradation von Jodaminosäuren zu vermindern, ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß es ein starkes Reduktionsmittel ist. Es scheint einen oxidativen Schritt der Degradation zu inhibieren (44). Obwohl MMI in pharmakologisch

vertretbaren Dosen keinen Effekt auf die T_4 -Dejodierung in vivo hat (41), konnten INOUE u.TAUROG (44) zeigen, daß die Degradation der Jodthyronine durch hohe Dosen MMI vermindert werden konnte.

Ein Vergleich unserer Ergebnisse (s.4.1.2) mit der oben angeführten Aussage ist nur teilweise möglich. Von uns wurde lediglich überprüft, ob hoch konzentrierter MMI-Zusatz eine optimalere Hormonausbeute gewährleistete. Die nach MMI-Zusatz im Mittel um 20% höher liegende Hormonausbeute scheint die von INOUE u.TAUROG getroffene Aussage zu bestätigen. Inwieweit dieses Ergebnis eine Inhibierungswirkung auf einen Bestandteil des Blutes darstellt, wurde nicht untersucht.

5.2 3',5'-Dijodthyronin-Assay

Im folgenden soll die Zuverlässigkeit des von uns entwickelten 3',5'- T_2 -Radioimmunoassay diskutiert werden.

Die Spezifität eines Radioimmunoassays, das heißt, die Konzentrationsbestimmung einer bestimmten Substanz ohne Mit-erfassung interferierender Substanzen, wird erstens beeinflusst durch das Fehlen einer homogenen, absolut spezifischen Antikörperpopulation, zweitens durch die Kreuzreaktionen mit anderen Antigenen oder Substanzen, die immunreaktive Molekülbereiche besitzen (56) sowie nach SKELLY und Mitarbeitern (79) auch durch Störungen der Immunreaktion durch Komponenten des Inkubationsmediums. Oblicherweise bestimmt man hierzu die Konzentration des nachzuweisenden Antigens und der kreuzreagierenden Substanz, die zu einer 50%igen Bindungsinhibierung des markierten Antigens führt

($B/B_0 = 50\%$). Dieser Quotient wird als relatives Maß der Spezifität (Kreuzreaktivitätsindex) angegeben. Wir untersuchten mehrere Verbindungen, die hinsichtlich ihres endogenen Vorkommens und ihrer strukturellen Ähnlichkeit potentielle Bedeutung besaßen (s.Kap. 4.3.3). Die höchste Kreuzreaktivität des 3',5'-T₂-Antiserums H128 wurde für rT₃ (1,3%) beobachtet. Berücksichtigt man eine stets vorkommende geringe Verunreinigung des 3',5'-T₂-Konjugates zur Immunisierung mit rT₃ oder umgekehrt die Verunreinigung von rT₃ mit 3',5'-T₂, so dürfte der wirkliche Kreuzreaktivitätsindex kleiner sein. Geringe Kreuzreaktivitäten fanden wir für T₄ (0,0043%), welches von allen Jodthyroninen in biologischem Material gewöhnlich in der höchsten Konzentration vorliegt, und für DIT (0,001%). Die Kreuzreaktionen dieser Verbindungen mit dem Antiserum dürften primär auf die gleichartige Anordnung von Jodatomen am äußeren Ring beruhen.

In der Tabelle 23 werden die molaren Kreuzreaktivitätsindices verschiedener Arbeitsgruppen aufgelistet. Die von uns ermittelten Kreuzreaktivitäten sind den Werten von GRUSSENDORF u. HOFNER (35) ähnlich. BURMAN und Mitarbeiter (9) konnten im Gegensatz zu uns keine Kreuzreaktivität mit T₄ nachweisen.

Der relativ hohen Kreuzreaktivität mit rT₃, aber auch mit DIT und T₄ wurde in unserem 3',5'-T₂-Assay durch konzentrationsabhängige Korrektur der Meßwerte Rechnung getragen. Ein Berechnungsbeispiel wurde in Kapitel 4.1.5.4 dargestellt.

Tab.23: Von verschiedenen Arbeitsgruppen bestimmte molare Kreuzreaktivitätsindices im 3',5'-T₂-Radioimmunoassay

	BURMAN et al. (9)	GRUSSENDORF et al.(35)	eigene Ergebnisse
DIT	---	---	0,001%
T ₄	---	0,01%	0,0043%
rT ₃	2,0%	1,2 %	1,3 %

Die Empfindlichkeit eines Radioimmunoassays wird entscheidend durch die Antikörperavidität bestimmt. Eine Charakterisierung der Empfindlichkeit läßt sich durch Angabe der unteren Nachweisgrenze und des 50%-Interceptpunktes der Standardkurve vornehmen (56).

Als untere Nachweisgrenze ihres Radioimmunoassays für 3',5'-T₂ aus nicht extrahiertem Serum gaben BURMAN und Mitarbeiter (9) einen mittleren Wert von 2 ng/dl, entsprechend 3,81 pmol/ml an. GRUSSENDORF u.HOFNER (35) ermittelten 0,3 ng/dl,entsprechend 0,57 pmol/ml 3',5'-T₂. Sie führten ihre Analyse in getrockneten Äthanolextrakten aus 1 ml Serum durch. Beide Werte lagen extrem höher als unsere im Schilddrüsenhydrolysat ermittelte Nachweisgrenze von 0,08 pmol/ml. Die von BURMAN und Mitarbeitern (9) angegebene Nachweisgrenze lag in der Höhe unseres 50%-Interceptpunktes von 4,2 - 4,4 pmol/ml Hydrolysat. Die hohen Werte der im nicht extrahierten Serum durchgeführten 3',5'-T₂-Bestimmung (9) dürften auf die hohe Kreuzreaktivität mit rT₃ im Serum zurückzuführen sein.

Weiterhin überprüften wir die Richtigkeit unseres 3',5'-T₂-Assays. Hierunter versteht man die Obereinstimmung der im Probenmaterial gemessenen Antigenkonzentration mit dem "wahren" Konzentrationswert. Ihr absoluter Wert wird durch Wiederfindungsexperimente mit der Reinsubstanz ermittelt (56).

In den von uns durchgeführten Versuchen betrug die durchschnittliche Wiederfindungsrate $102 \pm 9\%$. Aus dieser geringfügigen Abweichung von dem theoretisch zu erwartenden Wert von 100% ergab sich kein Hinweis auf einen systematischen Fehler der angewandten Methode.

Als Kriterium für die Präzision einer Methode dient der Grad an Obereinstimmung von Einzelwerten der gleichen Probe mit dem Mittelwert der Gesamtzahl der Messungen entweder im selben Analysenansatz (Intraassay-Reproduzierbarkeit) oder in verschiedenen Ansätzen (Interassay-Reproduzierbarkeit). Sie gibt das Ausmaß der methodischen Variabilität und die Größe des zufälligen Fehlers an und kann mit Hilfe statistischer Parameter zahlenmäßig erfaßt werden (56).

Der Variationskoeffizient für die Intraassay-Reproduzierbarkeit lag bei unseren im Schilddrüsenhydrolysat durchgeführten Messungen unter 6%. BURMAN und Mitarbeiter (9) gaben einen Variationskoeffizienten von 12% für die Intraassay-Reproduzierbarkeit im Serum an.

Die Interassay-Variationskoeffizienten von drei Kontrollseren, die in bisher drei Ansätzen mitliefen, betrugen 2 bis 11%. BURMAN und Mitarbeiter (9) ermittelten für normale 3',5'-T₂-Konzentrationen im Serum einen Variationskoeffizienten von 26%, für erhöhte 3',5'-T₂-Konzentrationen einen von 14%. Wie unsere Variationskoeffizienten anzeigen, scheint eine ausreichende Präzision des 3',5'-T₂-Radioimmunoassays gewährleistet zu sein.

Neben den Zuverlässigkeitskriterien ist die Praktikabilität für die objektive Beurteilung der Anwendbarkeit einer Methode von wesentlicher Bedeutung. Da die radioimmunologische Bestimmung von 3',5'-T₂ im Hydrolysat ohne vorhergehende Extraktion und nach einer praktikablen Inkubationszeit erfolgte, ist der erforderliche zeitliche und damit auch personelle Aufwand akzeptabel.

5.3 Jodaminosäurerekonzentrationen in der Schilddrüse und im Serum

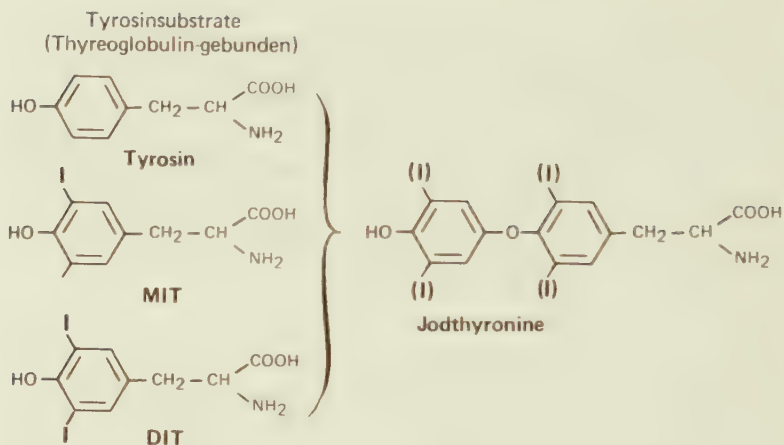
Quantitative Angaben über intrathyreoidale Jodaminosäurekonzentrationen in Ratten liegen bisher nur für T₄ und T₃ vor (1). Der Nachweis intrathyreoidaler Hormonkonzentrationen basierte in früheren Arbeiten (37, 67, 85, 91 u.a.) im wesentlichen auf einer papier- oder dünnschichtchromatographischen Separationstechnik von in vivo markierten Jodaminosäuren. Mit Hilfe empfindlicher Radioimmunoassays lassen sich die durch enzymatische Proteolyse freigesetzten Jodthyronine und Jodtyrosine direkt im Hydrolysat messen. Die phänomenologische Messung der Jodaminosäurespiegel stellt zwar lediglich eine Momentaufnahme des vorliegenden Hormonstatus dar; die Gegenüberstellung der Jodaminosäurekonzentrationen intrathyreoidal und im Serum bietet jedoch weitere Einblicksmöglichkeiten in die Hormonsynthese sowie periphere Stoffwechsellage.

In der Regulation bei Jodmangel spielt Thyreoglobulin eine wichtige Rolle. Dieses großmolekulare Eiweiß enthält nicht nur Thyroxin sondern auch dessen Vorstufen Mono- und Dijodtyrosin. Normalerweise enthält Thyreoglobulin ungefähr 0,5% Jod. Bei Jodmangel nimmt der Jodgehalt drastisch ab auf Werte unter 0,1% (7). Dies führt nun zu einer Umverteilung

des Jods unter dem T_4 , T_3 und deren Vorstufen.

Um dieses zu illustrieren, setzten wir Ratten einem zunehmenden Jodmangel sowie Jodüberschuß aus und bestimmten die DIT-Konzentrationen sowie das T_4 , T_3 , rT_3 , $3,3'$ - T_2 und $3',5'$ - T_2 im Schilddrüsengewebe und teilweise auch im Serum. In den Tabellen 18 bis 21 werden die mittleren Jodaminosäurekonzentrationen, in Tabelle 22 die wesentlichen Jodaminosäurequotienten aufgelistet.

Während die normale Rattenschilddrüse etwa 9 - 11 mal mehr T_4 als T_3 enthielt, verringerte sich der Quotient im Jodmangel auf 2:1, im Jodüberschuß stieg er auf 13:1. Die Möglichkeit des Thyreoglobulins, T_4 zu bilden, scheint begrenzt zu sein. Ungeachtet steigender DIT-Konzentrationen im Jodüberschuß kam es zu keinen signifikanten Veränderungen der intrathyreoidalen T_4 -Konzentration (Tab.20). Nach Sättigung des T_4 -Haushaltes veränderte sich die DIT-Utilisation. DIT kondensierte zwar weiterhin bevorzugt in β -Position, aber zunehmend mit MIT. Daraus folgte eine gesteigerte rT_3 -Synthese bei Jodüberschuß zuungunsten des T_3 , das trotz Jodüberangebotes nicht vermehrt gebildet wurde. Abbildung 15 zeigt tabellarisch die Kondensationsmöglichkeiten während der Biosynthese von Jodthyroninen.



Kopplungsposition (α -, β - Ring)			Jodthyronin- produkt
Tyrosin	MIT	DIT	
α	β	-	3' - T ₁
β	α	-	3 - T ₁
α	-	β	3',5' - T ₂
β	-	α	3,5 - T ₂
.	α	β	r T ₃
	β	α	T ₃
	$\alpha + \beta$	-	3,3' - T ₂
		$\alpha + \beta$	T ₄

Abb.15: Kopplungsmöglichkeiten in der Biosynthese von Jodthyroninen

Die Serumhormonkonzentrationen unterlagen keinen Schwankungen im Jodüberschußexperiment. Wahrscheinlich adaptiert sich die Schilddrüse an den Jodüberschußzustand, indem sie verstärkt intrazelluläres Jodid sezerniert (6). NAGATAKI u. INGBAR (60) konnten nachweisen, daß bei Tieren, die Jod im Überschuß erhielten, das endogene - durch Dejodierung der Tyrosine gewonnene Jodid - weniger effizient organisiert wurde als das per Jodination aus dem Blut aufgenommene Jodid. Voraussetzung hierfür wären aber zwei getrennte Kompartimente für endogenes und exogenes Jodid. Diese Vorstellung konnte sich noch nicht etablieren, doch bietet das Modell eine Erklärungsmöglichkeit für die Konstanz der T_4 - bzw. T_3 -Konzentration, ungeachtet der erhöhten absoluten Jodaufnahme in die Schilddrüse.

Mit abnehmendem Jodgehalt der Nahrung kam es zu einer Konzentrationsminderung des DIT. TAUROG (88) konnte nachweisen, daß es in diesem Zustand zu einem relativen Anstieg der intrathyreoidalen MIT-Konzentration im Verhältnis zum DIT kam. BORGI (7) zeigte, daß jodarmes Thyreoglobulin vor allem MIT enthielt. Die Tyrosine verminderten sich nicht linear proportional, vielmehr ging als erstes der DIT-Anteil zurück, während auch bei geringerem Jodierungsgrad noch genügend MIT vorhanden war. Dieses führte zu einer gehäuften Kopplung zwischen DIT und MIT, statt normalerweise zwischen zwei DIT-Molekülen, so daß eine bevorzugte Biosynthese von T_3 erfolgte.

Obwohl wir in Ermangelung eines geeigneten Radioimmunoassays die intrathyreoidalen MIT-Konzentrationen nicht messen konnten, wurden die Beobachtungen BORGI (7) durch unsere Ergebnisse voll bestätigt. Wie die deutliche Abnahme der intrathyreoidalen T_4/T_3 - und T_4/rT_3 -Quotienten bei reduzierter Jodzufuhr zeigten, kam es unter diesen Bedingungen in Relation zum T_4 zu einer bevorzugten Bildung der beiden Trijodthyronine - sowohl von T_3 als auch von rT_3 .

Neben dieser seit längerem bekannten Tendenz zur Bildung niedrig jodierter Thyronine bei Jodmangelernährung, läßt sich bei Betrachtung des T_3/rT_3 -Quotienten (s.Tab.22) als weiterer Aspekt erkennen, daß Veränderungen im Jodangebot das Kopplungsverhalten von MIT und DIT bei der Biosynthese der Jodthyronine beeinflussen. Der erhöhte T_3/rT_3 -Quotient unter Jodmangel veranschaulicht, daß MIT bevorzugt in β -Ring-Position zu biologisch aktivem T_3 eingebaut wurde. Demgegenüber fiel bei Jodüberschuß der T_3/rT_3 -Quotient auf Werte von 1,8, woraus sich die zunehmende Bildungswahrscheinlichkeit für rT_3 mit DIT in β - und MIT in α -Ring-Position ergab.

Analoge Schlußfolgerungen ließen sich aus den Verhältnissen der intrathyreoidalen $3,3'$ - T_2 - und $3',5'$ - T_2 -Konzentrationen ziehen, obwohl ihre Abhängigkeit vom Jodangebot weniger deutlich ausgeprägt war.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß der Jodinationsgrad des Thyreoglobulins offensichtlich bestimmt, ob ein MIT- oder ein DIT-Molekülrest als β -Ring in das beim Kopplungsprozeß gebildete Jodthyroninmolekül eingebaut wird. Lag DIT in der Schilddrüse im Überschuß vor, wurde es bevorzugt in β -Stellung kondensiert; kam es zu einem Überwiegen des MIT-Anteils im Thyreoglobulin, bildete dieses mit höherer Wahrscheinlichkeit als DIT den β -Ring des neuen Thyroninmoleküls.

Die von uns gemessenen T_4 - und T_3 -Serumkonzentrationen unter Jodmangel wie auch die daraus berechneten T_4/T_3 -Konzentrationsquotienten im Serum entsprachen den Ergebnisse anderer Publikationen (1, 19, 29, 67). Eine Übersicht über die von verschiedenen Arbeitsgruppen ermittelten Schilddrüsenhormonkonzentrationen im Serum unter normaler und Jodmangeldiät findet sich in Tabelle 24. Die unterschiedlichen Jodthyroninkonzentrationen der einzelnen Arbeitsgruppen hängen zum Teil mit der Dauer des Versuchs zusammen; haupt-

sächlich lassen sich diese Differenzen auf den unterschiedlichen Jodgehalt der Futtermischungen zurückführen. Allen Versuchen ist gemein, daß unter Jodmangeldiät die T_4 -Konzentration absinkt, die T_3 -Konzentration jedoch stabil bleibt. Auch bei unseren Untersuchungen ergaben sich - die Perchloratgruppe (IVa) ausgenommen - trotz zehnwöchiger Jodrestriktion keine signifikanten Veränderungen der T_3 -Serumkonzentrationen.

Tab.24: Von verschiedenen Arbeitsgruppen gemessene Serumthyroninkonzentrationen bei Eu- und induzierter Hypothyreose (Ergebnisse in pmol/ml)

Autoren		T_4	T_3
CHOPRA und Mitarbeiter (19)	Normalgruppe LID (60 d)	77 39	0,86 0,73
ABRAMS u.LARSEN (1)	Normalgruppe LID (90 d)	54 < 6,5	0,68 0,66
FUKUDA und Mitarbeiter (67)	Normalgruppe LID (91 d)	73 < 10,3	1,13 0,82
RIESCO und Mitarbeiter (67)	LID II, 90 d	9,1	1,08
eigene Ergebnisse	Normalgruppe LID (70 d)	54 11	1,31 1,60

Es wird vielfach diskutiert, welche Mechanismen die peripheren T_3 -Konzentrationen unter Jodmangelbedingungen stabil halten. Als Ursache werden eine bevorzugte thyreoidale Syn-

these und/oder Sekretion von T_3 und ein Ansteigen der peripheren Konversionsrate von T_4 zu T_3 genannt (1, 33, 49). Weiterhin ist auch eine Kombination der oben genannten Mechanismen möglich. Unsere Ergebnisse sprechen für die Annahme, daß die bei Jodmangel reduzierte T_4 -Synthese und -Sekretion vorwiegend durch eine vermehrte thyreoidale T_3 -Synthese und T_3 -Ausschüttung in die Zirkulation kompensiert werden. Diese Annahme ließ sich besonders schlüssig am Beispiel der Jodamino-säurekonzentrationen des Perchloratkollektiv IVa belegen. Im Schilddrüsengewebe dieser Versuchsgruppe ließen sich nur 0,5% der T_3 -Konzentrationen des Normalkollektivs nachweisen; die T_4 -Werte lagen unter der Nachweisgrenze unseres Assays. Der thyreoidale Jodspeicher war also derart entleert, daß die von der Schilddrüse sezernierten T_3 -Mengen nicht ausreichten, um die T_3 -Konzentration im Serum auf dem Normalniveau zu halten. Da peripher kein Thyroxin nachweisbar war, konnten durch periphere T_4 -Monodejodierung auch keine ausreichenden T_3 -Mengen gebildet werden.

Die Erhaltung des peripheren T_3 -Spiegels spielt eine bedeutende Rolle in der Adaptation an den Jodmangel. Zur Aufrechterhaltung der euthyreoten Stoffwechsellage unter Jodmangelbedingungen ist T_3 effizienter als T_4 , denn es besitzt eine etwa vierfach höhere hormonelle Aktivität als T_4 , während für seine Biosynthese nur 75% des Jodids benötigt werden (33). Ein anderer Aspekt des peripheren Schilddrüsenhormonmetabolismus unter Jodmangelbedingungen ist ein Ansteigen der Bindungsfähigkeit der Thyroxin-bindenden Proteine (73). Neuere Daten (11) lassen vermuten, daß es in Abhängigkeit von den T_3 -Serumkonzentrationen zu Veränderungen der Bindungsfähigkeit des TBG kommt. Dieser Mechanismus könnte ebenso wie die oben genannten Möglichkeiten eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung adäquater Serumkonzentrationen für freies T_3 spielen.

Die im Serum zirkulierende T_4 -Menge war entsprechend dem Grad des Jodmangels vermindert. Diese Konzentrationsminderung be-

wirkte als Gegenreaktion eine Hyperplasie der Schilddrüse: je niedriger der periphere T_4 -Spiegel sank, umso stärker war der strumigene Effekt.

Die Ergebnisse des Jodreexpositionsversuches belegten, daß schon eine geringe Jodsubstitution jodinsuffizienter Ratten zu einer Normalisierung der wichtigen Jodthyroninkonzentrationen im Serum sowie zu einer Strumarückbildung führte. Diese Daten bestätigen die Erfahrung, daß bereits schwache Variationen in der Jodaufnahme in endemischen Kropfgebieten wie der Schweiz zu einem erheblichen Rückgang dieser Erkrankung führten (81).

Seit 1956 ist bekannt, daß bei der Ratte rT_3 sowohl im Blut als auch in der Schilddrüse existiert (70). Dieses Jodthyronin wurde früher für biologisch inaktiv gehalten. Neuere Arbeiten zeigen jedoch, daß rT_3 ein wichtiges Produkt im T_4 -Metabolismus darstellt (18, 53). Es gibt Hinweise dafür, daß rT_3 über einen negativen Feedbackmechanismus eine indirekte metabolische Wirkung auf die T_4 -Dejodierungsrate zu T_3 ausübt (42, 53). TAUROG und Mitarbeiter (91) konnten sowohl für das Normalkollektiv als auch für das Jodmangelkollektiv rT_3 intrathyreoidal nachweisen. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen stellten sie keine Abhängigkeit der rT_3 -Konzentration vom Jodgehalt der Nahrung fest. Unsere Ergebnisse zeigen eine eindeutige Abhängigkeit der intrathyreoidalen rT_3 -Konzentration vom Jodangebot auf. Je jodsuffizienter die Schilddrüse war, umso mehr rT_3 wurde auch gebildet. Die Ergebnisse der oben genannten Arbeit (91) sind vermutlich auf ein andersartiges methodisches Vorgehen zurückzuführen, welches in einer in vivo-Markierung mit nachfolgender papierchromatographischer Auftrennung der markierten Jodaminosäuren bestand. Somit waren der Arbeit nur relative Angaben über Konzentrationsverhältnisse - bezogen auf radioaktives Jod - zu entnehmen. Unsere weitaus empfindlichere Methode, die Jodaminosäurekonzentrationen direkt mit Hilfe von Radioimmunoassays zu bestimmen, ermöglich-

te einen Vergleich der rT_3 -Konzentrationen in Abhängigkeit vom Jodstatus der Ratten.

Trotz der intrathyreoidal nachgewiesenen rT_3 -Konzentrationen gelang es TAUROG und Mitarbeitern (91) nicht, rT_3 im Blut der Venae thyreoideae nachzuweisen. Dieser Befund veranlaßte die Autoren zu der Annahme, daß rT_3 und die geringere jodierten Jodthyronine in keinen signifikanten Konzentrationen sekretiert werden. Dieses Ergebnis stützt die These von CHOPRA (16), daß das im Blut zirkulierende rT_3 hauptsächlich durch periphere Dejodierung des T_4 entsteht. Nach der These von CHOPRA (16) müßte es zu einem Absinken der rT_3 -Serumkonzentrationen bei niedrigen T_4 -Serumkonzentrationen kommen. Diese Hypothese konnte durch unsere Ergebnisse gestützt werden. Nur in den Kollektiven IIIa und IVa, in denen die periphere T_4 -Konzentration erheblich vermindert war, waren keine rT_3 -Serumkonzentrationen nachzuweisen. In den anderen Kollektiven (s.auch Tab.19 und 21) ermittelten wir eine von der Jodzufuhr und von der intrathyreoidalen rT_3 -Konzentration unabhängige rT_3 -Serumkonzentration.

ROCHE und Mitarbeiter (69) vermuteten, daß $3,3'$ - T_2 nach demselben Kopplungsprinzip in der Schilddrüse synthetisiert wird wie T_3 und T_4 , es also zur Kopplung zweier MIT-Moleküle kommt. TAUROG und Mitarbeiter (91) konnten $3,3'$ - T_2 nur in den Schilddrüsenhydrolysaten jodinsuffizienter Ratten nachweisen. In unseren Untersuchungen konnten wir im Schilddrüsengewebe aller Versuchsgruppe - die Perchloratgruppe IVa ausgenommen - $3,3'$ - T_2 nachweisen. In Abhängigkeit von der Jodzufuhr kam es in unseren Experimenten zu einem Anstieg des $3,3'$ - T_2 -Gehaltes der Kollektive.

Im Gegensatz zu ROCHE und Mitarbeitern (69), aber in Übereinstimmung mit TAUROG und Mitarbeitern (91) konnten wir kein $3,3'$ - T_2 im Rattenserum nachweisen. Unser Ergebnis nicht nachweisbarer $3,3'$ - T_2 -Konzentrationen im Rattenserum deckt sich mit $3,3'$ - T_2 -Messungen im menschlichen Serum durch MEINHOLD u.SCHÖRNBRAND (52), deren mittlere Normalkonzentration

unter der Nachweisgrenze ihres Assays von 18 pmol/l lag. Auch von VISSER und Mitarbeitern (93) wurde eine äußerst geringe mittlere Normalkonzentration von 20 pmol/l mitgeteilt, während einige andere Arbeitsgruppen (8, 10, 31, 36, 98) höhere 3,3'-T₂-Normalwerte für Humanserum ermittelten. Eine Bewertung dieser Ergebnisse ist schwierig, da in sämtlichen Fällen die Normalkonzentration aus dem unempfindlichen Bereich der jeweiligen Standardkurven nahe der Assaynachweisgrenze abgelesen wurden.

RUDOLPH und Mitarbeiter (71) konnten nachweisen, daß radioaktiv markiertes rT₃ in vivo zu 3',5'-T₂ dejodiert wurde. Mit dem von uns eingesetzten 3',5'-T₂-Radioimmunoassay waren wir in der Lage, diesen Hormonmetaboliten intrathyreoideal nachzuweisen. Die 3',5'-T₂-Konzentrationen fielen im Jodmangel ab und stiegen im Jodüberschuß gering an. Somit scheint auch dieser Metabolit abhängig vom Jodierungsgrad des Thyreoglobulins zu sein.

6 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die Anwendung radioimmunchemischer Methoden zur Untersuchung der Jodamino-säurekonzentrationen im Schilddrüsengewebe und im Serum von Ratten bei Jodmangel und Jodüberschuß beschrieben. Im Rahmen dieses Vorhabens wurde es erforderlich, ein radioimmunologisches Verfahren für 3',5'-T₂ aufzubauen.

Die radioimmunchemische Bestimmung des 3',5'-T₂ erfolgte direkt im Schilddrüsenhydrolysat. Die molare Kreuzreaktivität, die für verschiedene Jodthyronine und Jodtyrosine ermittelt wurde, betrug für rT₃ 1,3%, für T₄ 0,004% und für DIT 0,001%. Die untere Nachweisgrenze des mit Doppelantikörpertrennung arbeitenden Radioimmunoassays betrug 80 pmol/l. Die Intraassay-Reproduzierbarkeit war 6%; die Interassay-Reproduzierbarkeit in drei Ansätzen variierte zwischen 2% und 11%. Das dargestellte Verfahren erfüllte die methodischen Zuverlässigkeitskriterien.

Intrathyreoideal konnten T₄, T₃ und erstmals die Jodamino-säuren rT₃, 3,3'-T₂, 3'.5'-T₂ sowie DIT nachgewiesen werden.

In dem Jodmangelexperiment kam es zu einer Konzentrationsabnahme sowohl von T₄ und T₃ als auch von deren Metaboliten. Die Mittelwerte der Normalgruppe und der Jodmangelgruppe betrugen für T₄ 722 pmol/mg SD und 19 pmol/mg SD; für T₃ 73 pmol/mg SD und 9 pmol/mg SD; für rT₃ 21 pmol/mg SD und 1,5 pmol/mg SD; für 3,3'-T₂ 2,22 pmol/mg SD und 0,53 pmol/mg SD; für 3',5'-T₂ 3,05 pmol/mg SD und 0,59 pmol/mg SD. Die DIT-Konzentration des Normalkollektivs betrug im Mittel 2266 pmol/mg SD und nahm im Jodmangel auf 52 pmol/mg SD ab.

In dem Jodüberschußexperiment konnte keine signifikante Konzentrationszunahme für T₄ (671 pmol/mg SD), T₃ (61 pmol/mg SD) sowie für 3,3'-T₂ (1,75 pmol/mg SD) und 3',5'-T₂

(2,67 pmol/mg SD) nachgewiesen werden. Hingegen nahm die rT_3 -Konzentration von im Mittel 18,6 pmol/mg SD auf 29,2 pmol/mg SD zu. Die mittlere DIT-Konzentration steigerte sich von 1866 pmol/mg SD auf 2757 pmol/mg SD.

Anhand der intrathyreoidalen Thyronin- und DIT-Konzentrationsverhältnisse konnte gezeigt werden, daß wahrscheinlich der Jodinationsgrad des Thyreoglobulins die Syntheseraten der einzelnen Hormone beziehungsweise ihrer Metaboliten bestimmt. Lag DIT in der Schilddrüse im Überschuß vor, zum Beispiel in den Normalkollektiven und in den Jodüberschußgruppen, so wurde es bevorzugt in β -Stellung kondensiert. Kam es zu einem Überwiegen des MIT-Anteils im Thyreoglobulin, zum Beispiel im ausgeprägten Jodmangel, so bildete dieses mit großer Wahrscheinlichkeit den β -Ring des neuen Thyroninmoleküls.

Weiterhin konnte veranschaulicht werden, daß zur Aufrechterhaltung des peripheren T_3 -Spiegels unter mäßigem Jodmangel kompensatorisch vermehrt intrathyreoidal T_3 gebildet als auch sezerniert wurde. Die im Serum zirkulierende T_4 -Menge verminderte sich entsprechend dem Grad des Jodmangels; dadurch wurde eine Hyperplasie der Schilddrüse bewirkt. Mit dem Jodreexpositionsversuch konnte gezeigt werden, daß schon eine geringe Jodsubstitution sowohl zur Normalisierung der peripheren Hormonkonzentrationen als auch zur Strumarückbildung führte. Die Meßergebnisse der rT_3 -Serumbestimmung stützten die Hypothese, daß das im Blut zirkulierende rT_3 vorwiegend durch periphere Konversion von T_4 zu rT_3 entsteht. $3,3'$ - T_2 konnte von uns im Rattenserum nicht nachgewiesen werden. Im Gegensatz zum Jodmanglexperiment unterlagen die Serumhormonkonzentrationen im Jodüberschußexperiment keinen Schwankungen.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. ABRAMS, G.M., P.R. LARSEN
Triiodothyronine and thyroxine in the serum and thyroid glands of iodine-deficient rats.
J.clin.Invest. 52, (1973), 2522-2531
2. ALEXANDER, N.M.
Iodide peroxidase in rat thyroid and salivary gland and its inhibition by antithyroid compounds.
J.Biol.Chem. 234 (1959), 1530 - 1533
3. BELLABARBA, D., R.F. PETERSON, K. STERLING
An improved method for chromatography of iodothyronines.
J.clin.Endocrinol.Metab. 28 (1968), 305-307
4. BERSON, S.A., R.S. YALOW
Quantitative aspects of the reaction between insulin and insulin-binding antibody.
J.clin.Invest. 38 (1959), 1996-2016
5. BERSON, S.A., R.S. YALOW
Immunoassay of proteohormones.
In: G. Pinkus, K.V. Thiemann, E.B. Astwood eds:
The Hormones, Vol. IV.
Acad. Press NY (1964), 557-630
6. BRAVERMAN, L.E., S.H. INGBAR
Changes in thyroidal function during adaptation to large doses of iodide.
J.clin.Invest. 42 (1963), 1216
7. BORGI, H.
Pathophysiologie des euthyreoten Kropfes.
Therapiewoche 7/1980

8. BURMAN, K.D., D. STRUM, R.C. DIMOND, F.D. WRIGHT, J.M. EARLL, L. WARTOFSKY
A radioimmunoassay for 3,3'-di-iodothyronine (3,3'-T₂).
J.clin.Endocrinol.Metab. 45 (1977), 339-353

9. BURMAN, K.D., F.D. WRIGHT, R.C. SMALLBRIDGE, B.J. GREEN, L.P. GEORGES, L. WARTOFSKY
A radioimmunoassay for 3',5'-T₂.
J.clin.Endocrinol. Metab. 47 (1978), 1059-1064

10. BURGER, A., C. SAKOLOFF
Serum 3,3'-L-diiodothyronine, a direct radioimmunoassay in human serum: Method and clinical results.
J.clin.Endocrinol. Metab. 45 (1977), 384-391

11. CAMUS, M.M., R.D. HESCH, A.M. ERMANS
Interactions between plasma triiodothyronine and thyroglobulin as a possible control mechanism of the thyroid activity at the peripheral level.
In: Robbins, J., L.E. Braverman, eds:
Thyroid Res.Proc. 7th Int.Thyroid Conf. NY Am Elsevier 1976

12. CHOPRA, I.J., D.H. SOLOMON
Triiodothyronine in health and disease.
Endocrinology 4th Coup. Series No. 273
Amsterdam Excerpta Medica, 1163-1170, 1972

13. CHOPRA, I.J., D.A. FISHER, D.H. SOLOMON, G.N. BEAL
Thyroxin and triiodothyronine in the human thyroid.
J.clin.Endocrinol. Metab. 36 (1973), 311-316

14. CHOPRA, I.J.
A radioimmunoassay for measurement of 3,3',5'-T₃.
J.clin.Invest. 54 (1974), 583-592

15. CHOPRA, I.J., D.H.SOLOMON, U.CHOPRA
Reciprocal changes in serum reverse triiodothyronine (rT_3) and triiodothyronine (T_3) in systemic illness: evidence for independent pathways of thyroxine metabolism in adults.
J.clin.Endocrinol. Metab. 39 (1974), 501-511

16. CHOPRA, I.J.
An assessment of daily production and significance of thyroidal secretion of 3,3',5'-triiodothyronine (reverse T_3) in man.
J.clin.Invest. 58 (1976), 32-40

17. CHOPRA, I.J.
Nature, source and biological significance of thyroidhormone in blood.
In: S.C.Werner, S.H.Ingbar, eds.
Harper u.Row, New York 1978, 100-114

18. CHOPRA, I.J.
A study of extrathyroidal conversion of thyroxine to 3,3',5'-triiodothyronine in vitro.
Endocrinology 101 (1977), 453-463

19. CHOPRA, I.J., H.E.CARLSON, D.H.SOLOMON
Comparison of inhibitory effects of triiodothyronine, thyroxine, reverse triiodothyronine and 3,3'-diiodothyronine on thyrotropin releasing hormone-induced release of thyrotropin in the rat in vitro.
Endocrinology 103 (1978), 393-399

20. CHOPRA, I.J., D.H.SOLOMON
Activity of thyroxine and its deiodinated derivatives.
VI.International Congress Endocrinol., Melbourne, Australia, 1980

21. DeGROOT, L.J., A.M.DAVIS
Studies on the biosynthesis of iodotyrosines: A soluble thyroid iodine-peroxidase tyrosine-iodinase system.
Endocrinology 70 (1963) 492-504

22. DeGROOT, L.J., NIEPONMISZCZE, H.
Biosynthesis of thyroidhormone: basic and clinical aspects.
Metabolism 26 (1977), 665-718
23. DEISS, W.P., R.L. PEAKE, J. PEAKE
The mechanism of thyroid hormone secretion.
Ann. internal. Med. 69 (1968), 881-890
24. DEMPSEY, E.W.
Fluorescent and histochemical reactions in the rat thyroid gland at different states of physiological activity.
Endocrinology 34 (1944), 27-38
25. DiSTEFANO, J.J., D.A. FISHER
Peripheral distribution and metabolism of the thyroid hormones: A primarily quantitative assessment.
Pharm. Ther. B. 2 (1976), 539-570
26. DUMONT, J.
The action of thyrotropin on thyroid metabolism.
Vitam. Horm. 29 (1971), 287-299
27. DUNN, J.T.
The aminoacid neighbors of thyroxine in thyroglobulin.
J. Biol. Chem. 245 (1970), 5954-5961
28. EKINS, R.P.
The estimation of thyroxine in human plasma by an electrophoretic technique.
Cli. Chim. Acta 5 (1960), 453-459
29. FUKUDA, H., N. YASUDA, A. GREER
Changes in plasma thyrotropin, thyroxine and triiodo -
thyronine after acute and chronic administration
of iodide to iodine deficient rats.
Endocrinology 97 (1975), 1196-1204

30. GALTON,V.A., B.C.NISULA
The enterohepatic circulation of thyroxine.
J.Endocrinol. 54 (1972), 187-204

31. GAVIN,L.A., M.E.HAMMOND, J.N.CASTLE, R.R.CAVALIERY
3,3'-diiodothyronineproduction a major pathway of
peripheral iodothyronine metabolism in man.
J.clin. Invest. 61 (1978), 1276-1285

32. GLOCK,G.E.
Peroxidase activity of the thyroid.
Nature 154 (1944), 460-461

33. GREER,M.A., Y.GRIMM, H.STUDER
Qualitative changes in the secretion of thyroid
hormones induced by iodine deficiency.
Endocrinology 83 (1968), 1193-1198

34. GROSS,J.R., R.PITT-TIVERS, W.A.TROTTER
Effect of 3,5,3'-triiodothyronine in myxedema.
Lancet 1 (1952), 1044-1045

35. GRUSSENDORF,M., M.HOFNER
Immunextraction of apparent immunreactiv 3',5'-T₂
in euthyreoid and hyperthyroid sera.
In: J.R.Stockigt, S.Nagataki eds.:
Thyroid research 8.
Academy von Science, Canberra/Australian 1980,
337-340

36. GRUSSENDORF,M., M.HOFNER
Radioimmunoassay for 3,3'-diiodothyronine in
human serum.
Clin.Chim.Acta 88 (1978), 81-88

37. HAIBACH,H.
Fate of perfused iodothyronines in rat thyroid.
Metabolism 20 (1971), 819-829

38. Hais, I.M.
Aminosäuren.
In: Handbuch der Papierchromatographie;
Hais I.M., K.Maecek eds., Bd.I
Fischer, Jena (1963), 503-571
39. Hales, C.N., P.J.RANDALL
Immunoassay of insulin with insulin-antibody
precipitate.
Biochem.J. 88 (1963), 137-146
40. HALMI, N., R.PITT-RIVERS
The iodide pools of the rat thyroid.
Endocrinology 70 (1962), 660-672
41. HERSHMAN, J.M., L.van MIDDELSWORTH
Effect of antithyroid compounds on the deiodination
of thyroxine in the rat.
Endocrinology 71 (1962), 94-100
42. HÜFFGEN, B., R.KÜDDING, R.HEHRMANN, A.v.z.MOHLEN,
H.JOPPNER, R.D.HESCH
Biochemical basis of thyroid stimulation and thyroid
hormone action (Hrgs. Von zur Mühlen, A., H.Schleus-
ner)
Thieme Stuttgart (1976), 204-214
43. INGBAR, S.H.
Autoregulation of the thyroid response to iodide
excess and depletion.
In: 2nd F.Raymond Keating jr. Memorial Symposium,
Rochester MN
Mayo Clinic Proceedings (1972), 814
44. INOUE, K., A.TAUROG
Digestion of ¹³¹J-labelled thyroid tissue with
maximum recovery of ¹³¹J-iodothyronines.
Endocrinology 81 (1967), 319-332

45. INOUE, K., A. TAUROG
Sedimentation pattern of soluble protein from
thyroids of iodide deficient rats; acute effects
of iodide.
Endocrinology 83 (1968), 816-832
46. KESTON, A.
The schardinger enzyme in biological iodinations.
J. Biol. Chem. 153 (1944), 335-336
47. KLEBANOFF, S. J., C. JIP, D. KESSLER
The iodination of tyrosine by buf-thyroid preparations.
Biochim. Biophys. Acta 58 (1962), 563-574
48. LAMAS, L., M. L. DORRIS, A. TAUROG
Evidence for a catalytic role for thyroid peroxidase
in the conversion of diiodotyrosine to thyroxine.
Endocrinology 90 (1972), 1417-1426
49. LAMAS, L., G. MORREALE DE ESCOBAR
Iodoamino acid distribution on the thyroid of rats
on different iodine intakes and with normal plasma
protein bound iodine.
Acta Endocrinol. (Kbh) 69 (1972), 473-487
50. MEINHOLD, H., K. W. WENZEL
Zur Methodik der direkten radioimmunologischen Be-
stimmung von Trijodthyronin im Serum.
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 12 (1974), 477-486
51. MEINHOLD, H.
Radioimmunoassay of thyroxine in unextracted serum.
Horm. Metab. Res. 6 (1974), 169-170
52. MEINHOLD, H., P. SCHORNBRAND
3,3',5'-triiodothyronine (reverse T₃) in human serum
and its application in different thyroid states.
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 13 (1975), 571-574

53. MEINHOLD, H.
Reverse triiodothyronine.
New aspects of peripheral metabolism of the
thyroid hormones.
Nuc-Compact 8 (1977), 55-60
54. MEINHOLD, H., P. SCHORNBRAND
Radioimmunological measurement of 3,3'-diiodothyronine
in serum and amniotic fluid.
J.clin.Chem.clin.Biochem. 15 (1977), 419-424
55. MEINHOLD, H., H. SÜRJE
Herstellung markierter Schilddrüsenhormone und
verwandter Verbindungen von hoher spezifischer
Radioaktivität und hoher Aktivitätskonzentration.
In: Nuklearmedizin und Biokybernetik, K.Oeff, H.A.E.
Schmidt, Hrsg. - Bd.I, Medico Informationsdienste,
Berlin 1978, 185-192
56. MEINHOLD, H.
Schilddrüsenhormonmetaboliten.
Thieme Stuttgart (1980), 93-98
57. MITSUMA, T., J. COLUCA, L. SCHENKMANN, C.S. HOLLANDER
Rapid simultaneous radioimmunoassay for triiodo-
thyronine and thyroxine in unextracted serum.
Biochem.Biophys.Res.Commun. 46 (1972), 2107-2113
58. MÖHLEN, A., von zu
Grundlagen des radiochemischen Hormonnachweises.
In: Nuklearmedizin, Emmerich, D. Hrsg.
Thieme Stuttgart (1971)
59. NAGATAKI, S., H. UCHIMARA
Triiodothyronine and thyroxine in thyroid glands
of euthyroid Japanese subjects.
J.clin.Endocrinol.Metab. 35 (1972), 18-23
60. NAGATAKI, S., S.H. INGBAR
Demonstration of a second thyroidal iodide pool in
rat thyroid glands by double isotope labeling.
Endocrinology 73 (1963), 479-484

61. NAGATAKI, S.
Effect of excess quantities of iodide.
In: Greep, R.O., E.B. Astwood, eds.;
Handbook of physiology, Vol. III, Endocrinology.
Washington DC, American Physiological Society (1974)
329-392
62. NELSON, J.C., R.M. WEISS, J.E. LEWIS, R.B. WILCOX,
F.J. PALMER
A multiple ligand-binding radioimmunoassay of
diiodotyrosines.
J. clin. Invest. 53 (1974), 416-422
63. NILSON, S.F., P.A. PETERSON
Evidence for multiple thyroxine binding sites
in human prealbumin.
J. biol. Chem. 246 (1971), 6098-6105
64. NISWENDER, G.D.
Principles for the assessment of the reliability
of radioimmunoassay methods (precision, accuracy,
sensitivity, specificity).
Acta Endocrinol. (Kbh) 142 (1969), 163-184
65. PITT-RIVERS, R., R.R. CAVALIERI
The free diiodotyrosines of the rat thyroid gland.
Biochim. J. 86 (1963), 86-92
66. PITTMAN, C.S., J.B. CHAMBERS jr.
Carbon structure of thyroxine metabolites in urine.
Endocrinology 84 (1968), 705-710
67. RIESCO, G., A. TAUROG, P.R. LARSEN
Variations in the response of the thyroid gland
of the rat to different low-iodine diets; Correlation
with iodine content of diet.
Endocrinology 99 (1976), 270-280

68. ROBBINS,J., J.E.RALL
The iodine containing hormones.
In: Gray,C.H., A.L.BACHARACH, eds;
Hormones in blood, 2nd ed,
Acadm.Press NY Vol.I (1967), 383-490
69. ROCHE,J., R.MICHEL, W.WOLF, J.NUNEZ
Sur deux nouveaux constituants hormonaux du
corps thyroïde, la 3,3'-didiotothyronine et la
3,3',5'-triiodothyronine.
Biochim.Biophys. Acta 19 (1956), 308-317
70. ROCHE,J., R.MICHEL, J.NUNEZ
Sur la presence de la 3,3'-5'-triiodothyronine dans
le sang de rat.
C.R.Soc.Biol. 150 (1956), 20-24
71. RUDOLPH,M.T., A.SAKURADA, G.VAGENAKIS
Demonstration of sequential monodeiodination as the
major pathway of iodothyronine metabolism.
Clin.Res. 24 (1976), 429-436
72. SAKURADA,T., M.RUDOLPH, S.C.FANGS, A.G.VAGENAKIS,
L.E.BRAVERMAN, S.H.INGBAR
Evidence that triiodothyronine and reverse triiodo-
thyronine are sequentially deiodinated in man.
J.clin.Endocrinol. Metab. 46 (1978), 916-922
73. SCHRIEVECK,H.G., van den, P.DeNAYER, C.BECKERS,
M.DeVISSCHER
Endemic goiter in the Ueles: a study of thyroxine-
binding proteins.
J.clin.Endocrinol. Metab. 25 (1965), 1643-1647
74. SCHWARTZ,H.L., J.H.OPPENHEIMER
Physiologic and biochemical actions of thyroid
hormone.
Pharmacol.Ther.B. 3 (1978), 349-376

75. SELJELID,R.
Endocytosis in thyroid follicel ails v. on their
distribution of cytosomes following stimulation with
thyrotropic hormone.
J.Ulstrstruc.Res. 18 (1967), 479-488
76. SELJELID,R., K.F.NAKKEN
Endocytosis of thyroglobulin and the release of
thyroid hormone.
Scand.J.clin.Lab.Invest. 22 (1968), 125-143
77. SILVA,E.
Disposal rates of thyroxine and triiodothyronine
in iodine deficient rats.
Endocrinology 91 (1972), 1430-1436
78. SIMON,C., M.ROQUES, J.TORRESANI, S.LISSITZKY
Effect of propylthiouracyl on the iodination and
maturation of rat thyroglobulin.
Acta Endocrinol. 53 (1966), 271-285
79. SKELLY,D.S., L.P.BROWN, P.K.BESCH
Radioimmunoassay.
Clin.Chem. 19 (1973), 146-186
80. STANBURY,J.B., M.C.MORRIS
Deiodination of diiodotyrosine by cell-free-systems.
J.Biol.Chem. 233 (1958), 106-111
81. STECK,A., STECK,B., M.P.KÜNIG, H.STUDER
Auswirkungen einer verbesserten Jodprophylaxe auf
Kropfendemie und Jodstoffwechsel.
Schweiz.med.Wschr. 102 (1972), 829-837
82. STERLING,K., S.HAMADA, Y.TAKEMURA, M.A.BRENNER,
E.S.NEUMANN, M.INADA
Preparations and properties of thyroxine binding
alpha-globulin (TBG).
J.clin.Invest. 50 (1971), 1758-1771

83. STERLING, K.
Thyroxine in blood.
Mayo.Clin.Proc. 39 (1964), 568-608
84. STERLING, K., M.A.BRENNER, T.SAKURADA
Rapid effect of triiodothyronine of the mitochondrial
pathway in rat liver in vitro.
Science 210 (1980), 340
85. STUDER, H., M.A.GREER
The regulation in thyroid function in iodine deficiency.
Huber Verlag, Bern/Switzerland (1966)
86. SURKS, M.I., J.H.OPPENHEIMER
Concentration of L-thyroxine and L-triiodothyronine
specifically bound to nuclear receptors in rat liver
and kidney.
J.clin.Invest. 60 (1977), 555-562
87. TAUROG, A.
Thyroid peroxidase and thyroxine biosynthesis.
Rec.Prog.Horm.Res. 26 (1970), 189-247
88. TAUROG, A., G.RIESCO, P.R.LARSEN
Formation of 3,3'-diiodothyronine, 3',5',3-triiodo-
thyronine by thyroids of chronically iodine deficient
rats (Abstr.)
Meeting of the American Thyroid assoc. 18-21.Sept,1974
89. TAUROG, A., M.L.LOTHROP, R.W.ESTABROOK
Improvements in the isolation procedure for thyroid
peroxidase: nature of the heme prosthetic group.
Arch.Biochim.Biophys. 139 (1970), 221-229
90. TAUROG, A.
Biosynthesis of iodoamino acids.
In: Greep, R.O., E.B.Astwood, eds.;
Handbook of physiology, Vol.III. Endocrinology.
American Physiology Society (1974), 101

91. TAUROG, A., G. RIESCO, P. R. LARSEN
Formation of 3,3'-diiodothyronine 3',5'-3-triiodo-
thyronine in thyroid glands of rats and in enzymati-
cally iodinated thyroglobulin.
Endocrinology 99 (1976), 281-291

92. UTIGER, R. D.
Serum triiodothyronine in man.
Ann. Res. (1974), 289-302

93. VISSER, T. J., L.; KRIEGER-QUIST, R. DOCTER, G. HENNEMAN
Radioimmunoassay of 3,3'-diiodothyronine in unextracted
serum: The effect of endogenous triiodothyronine.
J. Endocrinol. 79 (1978), 357-362

94. WEBER, K. A., S. H. INGBAR
The contribution of thyroxine-binding prealbumin
to the binding of thyroxine in human serum as
assessed by immunoadsorption.
J. clin. Invest. 47 (1968), 1710-1721

95. WOLFF, J., M. E. STANDAERT, J. E. RALL
Thyroxine displacement from serum proteins and
depression of serum protein bound iodine by certain
drugs.
J. clin. Invest. 40 (1961), 1373-μ380

96. WOLFF, J., J. A. WILLIAMS
The role of microtubules and microfilaments in
thyroid secretion.
Rec. Prog. Horm. Res. 29 (1973), 299

97. WOLLMAN, S. H., S. S. SPICER, M. S. BURSTONE
Localization of esterase and acid phosphatase
in granules and colloid droplets in rat thyroid
epithelium.
J. Cell. Biol. 21 (1964), 191-201

98. WU, S.Y., I.J. CHOPRA, Y. NAKUMARA, D.H. SOLOMON,
L.R. BENETT
A radioimmunoassay for measurement of 3,3'-L-
diiodothyronine.
J.clin.Endocrinol. Metab. 43 (1976), 682-685
99. WYNN, J., R. GIBBS
Thyroxine degradation.
II. Products of thyroxine degradation by rat
liver homogenates microsomes.
J.Biol.Chem. 237 (1962), 3499-3505

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung für Nuklearmedizin (Leiter: Prof.Dr.med.K. Oeff) des Klinikums Steglitz der Freien Universität Berlin angefertigt.

Meinen besonderen Dank möchte ich Herrn Priv.Doiz.Dr.-Ing. H. M e i n h o l d für die Oberlassung des Themas, für wertvolle Anregungen und Diskussionen und für die aufmunternde Hilfe bei der Abfassung der Dissertation aussprechen.

Den Mitarbeitern des Bereichs Radiochemie, insbesondere Herrn C.H. K i m sowie des Tierlabors der Abteilung für Nuklearmedizin, Herrn J. F r a n k e und Herrn H. K a u e r t, schulde ich großen Dank für die immer bereitwillig gezeigte Unterstützung.

LEBENS LAUF

Name: Karin P e t e r s e n
geboren am 04.12.1950
Geburtsort: Struxdorf, Kreis Schleswig/Flensburg
Eltern: Peter Andreas Petersen
Maria Petersen, geborene Claussen

Schulbesuch:

1957 - 1961 Volksschule in Struxdorf
1961 - 1967 Klaus-Harms-Gymnasium, Kappeln a.d.Schlei
1967 - 1968 Höhere Frauenfachschule in Flensburg
1972 - 1975 Besuch eines Lehrgangs zum Erwerb der Hochschulreife an der Volkshochschule Schöneberg/Berlin
Dez. 1975 Ablegung der Reifeprüfung

Beruf:

01.04.1968 - Krankenpflegepraktikum an der Diakonissen-
15.09.1968 anstalt in Flensburg
01.10.1968 - Ausbildung zur medizinisch-technischen Assisten-
30.09.1970 tin am Hygiene-Institut Kiel
Sept. 1970 Ablegung des Examens
01.10.1970 - Anerkennungspraktikum in der Röntgenabtei-
30.03.1971 lung des St.Georg Krankenhauses in Hamburg
15.04.1971 - Röntgenassistentin in der Nordseeklinik We-
30.09.1971 sterland/Sylt
15.10.1971 - Laborassistentin im Jüdischen Krankenhaus
30.03.1972 Berlin
15.04.1972 - Laborassistentin in der Bundesversicherungs-
30.10.1972 anstalt Berlin
01.11.1972 - Technische Assistentin am Max-Planck-Institut
30.06.1974 für molekulare Genetik, Berlin
16.12.1976 - Laborassistentin im Krankenhaus Moabit
30.09.1980

Studium:

April 1976 Aufnahme des Studiums der Humanmedizin an
der Freien Universität Berlin
März 1978 Physikum

März	1979	I. Staatsexamen
März	1981	II. Staatsexamen
Aug.	1981 -	Praktisches Jahr am Klinikum Westend und
Aug.	1982	St. Gertrauden-Krankenhaus Berlin
Okt.	1982	III. Staatsexamen, schriftlicher Teil
Dez.	1982	III. Staatsexamen, mündlicher Teil.

Januar 1983 Approbation

Seit März 1983 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Pathologischen Institut der Freien Universität Berlin im Klinikum Steglitz.

